

Tesis Doctoral
Año 2004



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

El lipopolisacárido de *Bordetella bronchiseptica* como componente esencial en la colonización y persistencia de este patógeno en el hospedador

Tesis
13-09-04
57158

Antígeno O

Banda A
Banda B

BOBACION.....

A.....

Fecha

13-09-04

Inv. E.....

Inv.....

E.....

Federico B. Sisti



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS 1092

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Dra. Daniela Hozbor.

DONACION.....

A.....

Fecha 13.09.04

Inv. E.....

B

57159

Con todo mi amor a Juli y Valentino,
gracias a quienes comprendí que
existen sentimientos que son
imposibles de describir.

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Fundación Antorchas por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

Mi agradecimiento:

A la Dra. Daniela Hozbor, por dirigir mi trabajo y mi formación académica, por su permanente estímulo y principalmente, por brindarme su apoyo, confianza, amistad, por los valores que me transmitió aún en ocasiones en contra de mi voluntad inicial y por aceptarme como su becario casi sin conocerme y por permitirme seguir siéndolo una vez que me conoció. Por todo esto y muchas otras cosas más, gracias.

Al Prof. Dr. Antonio Lagares por permitirme trabajar con comodidad en su laboratorio, por brindarme su apoyo para obtener la beca de Postgrado y por sus consejos y apoyo desinteresado.

A Mariano Pistorio por las alegrías y enojos compartidos durante todo este tiempo, porque es importante saber que siempre hay alguien en quien se puede confiar.

A Maria Florencia Del Papa por acompañarme en toda esta etapa con su experiencia, su afecto, y por supuesto por todos los caramelos y tortas.

A Augusto J.L. Pich Otero por haber compartido momentos inolvidables en el Instituto y fuera de él, por los pases de gol que alguna vez supo dar. Por todas las cosas que me consiguió para que experimentos de esta Tesis pudieran hacerse.

A Aníbal Lodeiro por todas las veces que colaboró de alguna u otra forma en esta Tesis, por su apoyo y estímulo en todas las actividades que realicé en la Facultad, por enseñarme durante muchos viernes artes marciales y a sus R3 boys: Silvina (Pity) López García, Tirso Vazquez, Ignacio Quelas, Elías Mongiardini y Julia Althabegoiti por su espontáneo afecto, por darme siempre la mano que necesité, sobre todo en aquellas que tuvieron que ver con lo personal.

A Walter Draghi por su permanente buena disposición y por enseñarme a usar un fermentador sin que se contamine.

A María Laura Molinari por su compañerismo y permanente disponibilidad para ayudarme.

A Matías Fingermann por su interés en nuestro trabajo, por su buena onda y por silbar bajito mientras trabajamos.

A mis padres y hermanos por su permanente e incansable cariño y aliento, durante todo este largo tiempo. A mis abuelos, Irma y Elo, que siempre se interesan en lo que estoy haciendo. A Puchín y Luciana a quienes quiero mucho. A Emilio, a quien extraño mucho.

A Alberto, Mary y Caro, por su ayuda permanente, su cariño, confianza y por supuesto todas las cenas y algunos almuerzos. Sin el cariño de todos ellos este trabajo hubiera sido imposible.

A los profesores Gabriel Favelukes, Oscar Grau, Victor Romanowski y Mario Aguilar, por sus consejos y permitirme utilizar sus equipos.

A todos mis compañeros del IBBM que de alguna u otra manera me ayudaron durante todos estos años: Laura Balagué, Pablo Riccilo, Juan Carlos López, Verónica López, Cecilia Muglia, Katy López, Mónica Collavino, Germán Robles, Pedro David Gara, Daniel Grasso, Vanina Perez, Omar Riva, Gonzalo Legarreta, Daniel Ghiringuelli, Selma Gago Zachert, María Laura García, Verónica El Mujtar, Diego Posik, Alejandra Manzán, Silvia Moya, Alejandra Tortorici, Eloisa Arana, Christina Mc Carthy, Cecilia Zaneck, Marina Biedma, Eduardo Peña, Eitel Peltzer, Nora Martinez, Karina Reyes, Laura Diberto, Carlitos Illiano, Rubén Bustos y Catalina López.

Al Enterprise, mi ¿segundo? hogar, por aislarme de la realidad.

A todos con los que alguna vez compartí mañanas, tardes o noches de docencia, charlas y química casera experimental en la Cátedra de Introducción a la Química.

A Edgardo Donati por permitirme realizar mis primeros pasos en la docencia e investigación.

A Fabricio Maschi y Pilar Cagliada por su colaboración desinteresada en el manejo de los animales de laboratorio.

A Juan Carlos López por los litros y litros de sangre de caballo que utilizamos en los medios de cultivo.

A María Eugenia Rodriguez por los ensayos con células de los capítulos III y V.

Al CINDEFI por permitirme utilizar los equipos.

A Corel Draw y Photo Paint, por todas las noches compartidas.

Y a todos aquellos que en este momento me estoy olvidando.....que deben ser muchos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La interacción entre bacterias patogénicas y organismos superiores es un proceso dinámico muy complejo que transcurre a través de una serie de eventos que involucran la participación de múltiples factores bacterianos y de numerosos mecanismos de defensa generados por el hospedador. Gracias a la biología molecular, muchos de los factores bacterianos involucrados en el desarrollo del ciclo infeccioso de diferentes patógenos han sido identificados y caracterizados y la regulación de su expresión ha sido estudiada. Por su parte la biología celular y la puesta a punto de modelos animales, ha permitido analizar el rol *in vivo* e *in vitro* de estos factores; y gracias al desarrollo y a la relativamente rápida incorporación en el área de inmunología de nuevas metodologías de estudio de alto poder resolutivo, se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos de defensa del hospedador. Sin embargo, para muchos patógenos quedan varios interrogantes por contestar y aspectos por estudiar cuya resolución y avance permitirían la obtención de un modelo acabado de la interacción patógeno – hospedador. Así, desde el punto de vista del estado de conocimiento del patógeno, del rol de sus componentes y de las estrategias que desarrolla para causar la infección, un claro déficit en el conocimiento recae en los componentes bacterianos de naturaleza no proteica tales como los diferentes polisacáridos de la superficie bacteriana (cápsula, exopolisacáridos, lipopolisacáridos). Esto se debe quizás a que estas moléculas en general son más complejas que las proteínas, que requieren metodologías de estudio muy específicas y cuyas estructuras, genética y bioquímica aún hoy no están del todo esclarecidas.

Los estudios sobre la patogénesis de las diferentes especies el género *Bordetella* no escapan a esta generalidad ya que durante muchos años las investigaciones sobre este género se focalizaron casi exclusivamente sobre factores de naturaleza proteica y es por ello que se sabe relativamente poco sobre componentes de superficie tales como el lipopolisacárido (LPS). El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa cuya diversidad estructural hace pensar en un protagonismo directo en la comunicación del patógeno con los diferentes entornos. Sólo a fines de la década del noventa, el LPS de *Bordetella* y más específicamente de *B. bronchiseptica* ha surgido como una de las moléculas responsables de la resistencia al suero, a antibióticos y a varios péptidos antimicrobianos denominados defensinas (20, 355).

Recientemente se ha reportado además la variabilidad estructural del LPS frente a diferentes señales externas y en el curso de la infección (134, 203, 341). Sin embargo al presente queda aún por establecer su contribución y la de su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia en el hospedador.

Nosotros hemos focalizado este trabajo de Tesis al estudio del rol de uno de los principales componentes bacterianos superficiales de naturaleza no proteica, el lipopolisacárido, en la colonización temporal de la mucosa respiratoria y la persistencia de *Bordetella bronchiseptica* en el hospedador. Esta etapa de persistencia de la bacteria en el hospedador es la menos estudiada pero no por ello la menos importante. Las bacterias que persisten contribuyen a la existencia de focos de contagio dificultando una

del hospedador. En la Tabla I.1 se detallan a modo de ejemplo algunas de las adhesinas descritas para diferentes patógenos. Como puede observarse, en ocasiones existe más de una adhesina para el mismo patógeno, de esta forma el patógeno aseguraría el paso inicial que le permite establecer la infección. En relación a los receptores es poco lo que se conoce acerca de su naturaleza. Esto puede deberse a que el estudio de la patogénesis se ha enfocado históricamente desde el punto de vista del patógeno, por ser más sencillo, que desde el hospedador.

Tabla I.1. Adhesinas y sus receptores de diferentes patógenos.

Microorganismo	Enfermedad	Adhesina/Receptor	Célula o tejido del hospedador donde ocurre la adhesión
<i>Bordetella pertussis</i>	Coqueluche.	Hemaglutinina filamentosas, pertactina, fimbrias/?.	Epitelio respiratorio.
		Hemaglutinina filamentosas/CR3	Macrófagos.
Virus influenza	Influenza.	Hemaglutinina viral/ácido neuramínico.	Epitelio respiratorio.
Virus Epstein-Bar	Fiebre Glandular.	Proteína de envoltura viral/CR2.	Células B.
VIH	SIDA.	gp120/CD4.	Células T CD4 ⁺
<i>Chlamydia spp</i>	Conjuntivitis, uretritis.	glicosaminoglicano similar a heparina(GAG)/receptor de GAG.	Conjuntiva, epitelio uretral.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonía atípica.	Pie del micoplasma/ácido neuramínico.	Epitelio respiratorio.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrea.	Pili tipo IV/residuos de glucosamina.	Epitelio uretral.
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera.	Pili (N-metilfenilalanina)/ Carbohidratos con fucosas o manosas.	Epitelio intestinal.
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Diarrea.	Intimina/?.	Epitelio intestinal.
<i>Escherichia coli</i> (UPEC)	Pielonefritis.	Fimbria P/Gal(α1-4)Gal. Pili P/Globobiosa presente en ceramida.	Tracto urinario.
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Colitis hemorrágica, SUH.	Intimina/?.	Epitelio colónico.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis.	Fimbrias tipo I y II/receptor de EGF.	Epitelio intestinal.
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre entérica.	Fimbria tipo I/?.	Epitelio intestinal.
<i>Streptococcus mutans</i>	Caries.	glicosil transferasa/glicoproteína	Dientes.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía.	Proteína de membrana/N.acetilhexosamina-galactosa.	Epitelio mucoso.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diferentes enfermedades.	Internalina/?.-	
<i>Yersinia spp</i>	Diarrea.	Invasina, Ail (membrana asociada a membrana), Adhesina de Yersinia/?.	Epitelio intestinal.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Diferentes enfermedades.	Proteína de membrana/Extremo N-terminal de fibronectina.	Epitelio mucoso.
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria.	merozoito/glicoporina A, B.	Eritrocitos.
<i>Babesia</i>	Babesiosis en gatos.	Adhesión mediada por complemento al receptor de C3b.	Eritrocitos.
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea.	Taglina/manosa-6-P.	Epitelio yeyunal o duodenal.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería.	Lectina/conjugados de N-acetilglucosamina.	Epitelio colónico.

Ref. Mims Pathogenesis of Infections Diseases. Fourth Edition. Stephen Ed. 1995, Academic Press. NY.

Un aspecto interesante para remarcar es que las adhesinas pueden, además de intervenir en la adhesión del patógeno, disparar señales dentro de la célula eucariota que desencadenan diferentes cambios bioquímicos como secreción de citoquinas, inducción de muerte celular programada o necrótica, inducción de rearrreglos en la conformación de proteínas estructurales como actina, inhibición del transporte de iones o del movimiento ciliar. Estos cambios bioquímicos en general favorecen a la colonización definitiva del patógeno. Así, el proceso de adhesión en conjunto con los cambios inducidos, permiten al patógeno no ser removido por los mecanismos de eliminación tales como movimiento ciliar o secreción de mucus entre otros, utilizados por el hospedador como defensa.

Una vez adherido de manera específica en el tejido blanco, el patógeno se multiplica. Para ello utiliza los nutrientes del medio circundante dentro del hospedador. En principio es posible suponer que los fluidos corporales son excelentes medios de cultivo, pero sin embargo, existe limitación en el hierro biodisponible ya que este ión se encuentra secuestrado por moléculas específicas del hospedador (Ej: transferrinas, lactoferrinas). En estas condiciones numerosas bacterias sintetizan y secretan complejantes de hierro con alta afinidad (sideróforos) que compiten por este ión con los quelantes propios del hospedador. De esta forma las bacterias son capaces de captar el hierro circulante y utilizarlo para su crecimiento. La delección de estos mecanismos de adquisición de hierro genera cepas que se denominan avirulentas y que no son capaces de inducir infección (26,155,160,334).

El patógeno en todo momento de la infección debe **evadir las defensas del hospedador**, en particular aquellas que son bactericidas como la fagocitosis y la acción del complemento. Algunos patógenos son resistentes a la acción bactericida debido a la presencia de alguna estructura particular (Ej: LPS en bacterias Gram negativas, (212, 176); PspA de *Streptococcus pneumoniae* (175); Brka de *Bordetella pertussis* (103). La mayoría de los patógenos han desarrollado mecanismos específicos que le permiten resistir las principales defensas del hospedador, entre ellos **variaciones en las estructuras antigénicas** del patógeno para no ser reconocida por la respuesta ya montada en el hospedador, mecanismos de **evasión del proceso fagocítico**, **supervivencia intracelular**, **crecimiento en forma de biofilms**, etc. (140, 192, 300, 328).

La **variación antigénica** ocurre con un alta frecuencia en el patógeno incluso durante el transcurso de un mismo ciclo infeccioso. Esta variación puede ocurrir a través de mutaciones o recombinaciones a nivel génico que permiten la variación de la estructura de determinados antígenos en general presentes en la superficie bacteriana (140, 192, 300) o a través de sistemas de traducción de señales que median la alternancia, entre dos estados fenotípicos diferentes (Tabla I.3).

En relación a la **evasión de la actividad fagocítica** por parte del patógeno, esta puede ocurrir a través del bloqueo de alguno de los pasos de la fagocitosis, esto es: contacto, envoltura, formación del fagosoma, fusión del lisosoma, digestión y muerte. A su vez es posible para algunas bacterias sobrevivir dentro del fagosoma (18), o escapar del mismo llevando una vida intracelular fuera del alcance de la respuesta inmune del hospedador (74, 142, 360). Algunas bacterias han desarrollado incluso mecanismos para interferir en las

señales intracelulares normales de las células de manera de inducir o prevenir según su conveniencia la muerte celular (118). Esta muerte en la mayor parte de los casos es inducida a través de un mecanismo fisiológico normal denominado apoptosis o muerte celular programada. El rol de la inducción o inhibición de la apoptosis en la patogénesis puede ser variado dependiendo del tipo de célula eucariota de que se trate. Así en células del sistema inmune el patógeno induciría apoptosis de manera de eliminar esta célula agresora para el patógeno y en otras inhibirá la apoptosis de manera que el patógeno pueda vivir intracelularmente en ella. En el capítulo V de la presente Tesis se analizará este proceso en particular.

La posibilidad que presentan algunas bacterias de **sobrevivir intracelularmente** les otorga una gran ventaja en cuanto a la evasión de defensas del hospedador. La respuesta humoral generada durante la etapa extracelular de la infección no puede alcanzar al patógeno una vez alojado dentro de las células eucariotas. A su vez la manipulación de los diferentes mecanismos presentes en la célula por parte de la bacteria permiten la supervivencia (alteración del tráfico lisosomal, resistencia a la actividad oxidante del lisosoma, etc) (51, 113, 161, 282, 316) y/o diseminación intercelular del patógeno a través de la polimerización de actina (30, 74, 328, 332).

Finalmente, la **formación de biofilms** en los tejidos del hospedador impiden de manera estérica la llegada de la acción bactericida de los diferentes integrantes del sistema inmune. La posibilidad de la formación de este tipo de estructuras otorgan a la bacteria una resistencia superior a ser erradicada que la observada en las bacterias aisladas en su forma libre. A su vez el biofilm se constituye en un reservorio productor de nuevas bacterias libres que se diseminarán al resto del organismo hospedador.

En cuanto a la **diseminación del patógeno**, éste puede en ocasiones infectar zonas secundarias al sitio inicial de infección de forma de colonizar otros tejidos e incluso persistir dentro del hospedador. La diseminación puede ocurrir dentro del mismo órgano (Ej: *Salmonella spp*), a través de diferentes órganos de un mismo aparato (Ej: *Bordetella spp*) o utilizando la vía sanguínea o linfática al resto del hospedador (Ej: *Yersinia spp*), generando en este último caso una enfermedad sistémica. El proceso de diseminación requiere en general de un proceso de invasión de la célula a la que previamente se había adherido. Para ello, algunos patógenos expresan ciertas adhesinas que estimulan la internalización a la célula blanco, por ejemplo la bacteria Gram negativa *Listeria monocytogenes*, a través de dos proteínas InlA y ActA es capaz de introducirse en células epiteliales, inducir la polimerización de actina de la célula y utilizarla para moverse entre diferentes células epiteliales (197, 318).

Otros patógenos bacterianos utilizan la inducción de un daño tisular como factor de invasión y es este daño el que produce la enfermedad. La lesión tisular se produce en la mayor parte de los casos producto de la liberación de toxinas. Éstas son en general solubles y son secretadas al medio extracelular durante el crecimiento de la bacteria. En la Tabla I.2 se presentan los principales tipos de toxinas bacterianas descriptas hasta el momento.

Tabla I.2. Clasificación de los principales grupos de toxinas bacterianas conocidas hasta el momento.

Clase de toxina	Ejemplo	Modo de acción	Referencia
Endotoxina	Componente lipídico del LPS (lípid A) de bacterias Gram negativas	Inducción de IL-1, TNF- α , mediada por LBP-CD14-TLR-4	8,31
Exotoxina	Hemolisinas	Formadoras de poros en la membrana o fosfolipasas	237,238,249
Moduladoras de actividad enzimática	ADP-ribosilasas. (toxinas colérica y pertussis y toxina de <i>Salmonella</i>).	Inactivación de proteínas G mediante ADP-ribosilación de las mismas.	209,215,256
	Adenilato ciclasas. (AC-Hly de <i>B. pertussis</i> , factor edematoso de Anthrax)	Aumento de la cantidad citosólica de AMP _c .	257
	Proteín fosfatasas (YopH de <i>Yersinia spp</i>)	No determinado	33
Enzimas convertidoras	Proteasas de IgA, peptidasa de C5a.	Proteólisis de IgA o C5a	63,194,264
	Toxina botulínica y tetánica.	Bloqueo de neurotransmisión por clivaje de sinaptobrevina	309
	Toxina shiga	Degradación de ARNr	265,263
Inductoras de vacuolación	VacA de <i>Helicobacter pylori</i>	Desconocido	87,270

En el proceso de **reinfección**, el patógeno es capaz de trasladarse desde un hospedador a otro, causando la propagación de la enfermedad. Este es un paso importante del proceso infeccioso ya que permite perpetuar la existencia del patógeno más allá del ciclo de vida del hospedador. El pasaje desde un hospedador a otro en ocasiones requiere de una estadía previa en el exterior del hospedador. Las diferentes situaciones en que puede encontrarse el patógeno marcan la necesidad de una regulación precisa de los diferentes factores involucrados en cada estadio. Esta regulación se encuentra mediada por factores de origen bacteriano o ambientales o ambos. Los primeros incluyen factores involucrados en señalizaciones entre bacterias como el fenómeno de *quorum sensing* (95, 156). La concentración de componentes bacterianos particulares hasta un nivel crítico inducen la expresión de determinados genes en toda la población bacteriana. Esta inducción posee la particularidad de ser simultánea en toda la población actuando de esta manera como un todo y no como bacterias particulares. Esto le permite a toda la población responder ante eventos que suceden en el medio ambiente como un aumento importante de la población total, con la consecuente limitación en las fuentes de carbono y energía. En general los componentes utilizados para la señalización de *quorum sensing* son específicos para cada especie, pero en ocasiones es posible observar actividad entre diferentes especies del mismo género. Los factores de origen ambiental pueden ser físicoquímicos, como temperatura, pH u osmolaridad o moleculares como la presencia de determinados iones o moléculas más complejas (119, 128, 273). Los mecanismos a través de los cuales las bacterias son capaces de sensar la presencia de alguno de los factores ambientales pueden ser clasificados según su ubicación celular. A continuación (Tabla I.3) se resumen los principales mecanismos de reconocimiento descritos hasta el momento.

Tabla I.3. Mecanismos de reconocimiento de señales extracelulares por parte de patógenos bacterianos.

Mecanismo de reconocimiento de señales	Ejemplo	Referencia
Mecanismo transmembrana		
Sistemas de dos componentes	PhoPQ (<i>Salmonella spp</i>)	72
	BvgAS (<i>Bordetella spp</i>)	351
	AgrAS (<i>Staphylococcus aureus</i>)	369
Proteína activadora de membrana	ToxRS (<i>Vibrio spp</i>)	72
	PsaEF (<i>Yersinia spp</i>)	371
	CCadC/LysP (<i>E. coli</i>)	370
Mecanismos intracelulares.		
	Proteínas tipo AraC	372
	UreR (Uropatógenos Gram negativos)	94
	VirF (<i>Yersinia spp</i>)	373
	ToxT (<i>V. cholerae</i>)	72

La expresión regulada de los diferentes factores bacterianos no sólo es necesaria para el ciclo infección-reinfección sino también a lo largo de todo el proceso infectivo ya que no en todo momento el patógeno necesita del mismo grupo de factores. Las estrategias de regulación permiten al patógeno el logro de un ciclo infeccioso efectivo.

El delgado equilibrio presente entre los dos protagonistas, patógeno y hospedador, puede perdurar en el tiempo originándose una infección crónica o persistente. En general esta fase de la enfermedad es la menos estudiada pero no por ello la menos importante. De hecho es en esta fase en donde el microorganismo se disemina silenciosamente, producto de procesos adaptativos tendientes a no generar un daño en el hospedador que resulten al final perjudicial para el patógeno. A su vez en estos estadios de la enfermedad, la respuesta inmune por parte del hospedador, al menos, no es suficiente para eliminar al patógeno. El periodo crónico de la enfermedad resultaría así de una evolución conjunta de los dos participantes de la interacción patógeno – hospedador. Un patógeno que perjudica gravemente la salud de su hospedador sólo podrá reproducirse y necesitará de la presencia de un número considerable de hospedadores susceptibles. En cambio, el patógeno que es capaz de persistir de manera crónica dentro del hospedador no necesita de la presencia de un número importante de individuos susceptibles y utiliza al portador asintomático como reservorio hasta el momento adecuado en que puede diseminarse hacia otro individuo. Esta estrategia de supervivencia del patógeno requiere de una alta especialización de distintos factores necesarios para las diferentes etapas del ciclo infeccioso y por ello una regulación muy estricta de la expresión de los mismos.

Para erradicar de manera definitiva una enfermedad causada por un patógeno capaz de persistir en el hospedador se debe pensar en diseñar estrategias que inhiban no sólo la colonización sino también la persistencia del patógeno en el hospedador. De esta manera se impediría la diseminación y la presencia de portadores asintomáticos que actuarían de reservorios del patógeno.

Interacción *Bordetella* spp - hospedador

El patógeno: definición de un género propio

De las distintas especies del género *Bordetella*, la más estudiada es *B. pertussis*, que es el agente causal de la tos convulsa, coqueluche o pertussis. Al contrario de lo que sucede con enfermedades descritas ya por Hipócrates como la difteria o el tétano, la historia de la tos convulsa es relativamente reciente ya que los reportes de síntomas relacionados con esta enfermedad sólo aparecen después del siglo XVI. De hecho la primera descripción de tos convulsa o síndrome coqueluchoide fue realizado en 1640 por Baillou, durante una epidemia en París que presentaba los síntomas característicos de esta enfermedad (68). Su agente etiológico probablemente haya sido descrito por algunos fisiólogos durante los últimos años del siglo XIX pero su caracterización comienza con el aislamiento de un pequeño bacilo sin movilidad realizado por primera vez por Jules Bordet y Octave Gengou en 1904. Este bacilo que fue obtenido de un paciente durante un episodio de catarro podía aglutinar el suero proveniente de los pacientes enfermos, dato que se tomó como confirmación de que se trataba del agente etiológico de la enfermedad (38). Inicialmente a esta bacteria se la denominó *Haemophilus pertussis* a causa de su requerimiento de un medio suplementado con sangre para poder crecer. Sin embargo a diferencia de las bacterias del género *Haemophilus*, el agente causal aislado no necesita de la presencia de los factores X y V para crecer. Finalmente y luego de varios cambios, este microorganismo fue clasificado dentro de un género propio que se denominó *Bordetella* en honor a Jules Bordet. Las otras especies pertenecientes a este género fueron describiéndose posteriormente con lentitud, a pesar de que *Bordetella bronchiseptica* fue descrita por primera vez en 1910 como patógeno respiratorio de varios mamíferos con el nombre de *Bacillus bronchisepticus* (105, 106, 222). En el año 1923 Bergey incorpora a *Bacillus bronchisepticus* al género *Alcaligenes* por su incapacidad de fermentar glúcidos. Finalmente, en 1952 se describe el género *Bordetella*, en donde *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* quedan clasificadas en forma definitiva (255). Sus incorporaciones fueron posteriormente confirmadas sobre la base de varios criterios incluyendo morfología, propiedades fisiológicas y antigénicas, estudios de hibridación de ADN y tipificación por fagos. Otra especie incorporada al género y relacionada con enfermedades en humanos con síntomas más leves es *B. parapertussis*, descrita por primera vez en 1937.

Las distintas especies del género *Bordetella*.

El género *Bordetella* pertenece a la subclase β de las Proteobacterias. Dentro de este grupo se encuentran también los géneros *Achromobacter* y *Alcaligenes*, que junto a *Bordetella* forman un grupo de organismos muy relacionados entre sí al que se ha denominado complejo *Alcaligenes – Achromobacter – Bordetella* (AAB).

Hasta el momento, han sido reportadas ocho especies dentro del género *Bordetella*, todas ellas cocobacilos Gram negativos aerobios estrictos no fermentativos (Tabla I.4). El contenido de GC de las diferentes especies se encuentra entre 65 y 68% y su

temperatura de crecimiento óptimo se encuentra comprendido en el rango de 35 a 37° C. Todas las especies aglutinan los eritrocitos de una gran variedad de mamíferos. Son patógenos principalmente de mamíferos, siendo el humano el único hospedador conocido para *B. pertussis*. Varias de las especies se pueden distinguir fácilmente a través de pruebas bioquímicas, entre las que se pueden mencionar prueba de ureasa, catalasa, oxidasa, movilidad y posibilidad de reducir el nitrato (Tabla I.4).

B. pertussis es el agente etiológico de la tos convulsa o coqueluche, una enfermedad altamente contagiosa que se caracteriza por episodios de tos paroxística o tos quintosa. Es un patógeno obligado del hombre y no hay evidencia hasta el momento de nichos animales o ambientales para esta bacteria. *B. parapertussis* produce en humanos una sintomatología más leve que *B. pertussis* y en ovejas una neumonía crónica (368). A diferencia de lo que ocurre con *B. pertussis* y *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* presenta un amplio rango de hospedadores posibles, causando enfermedad respiratoria en diversos mamíferos incluyendo a perros, roedores, caballos y cerdos. Recientemente se ha detectado la presencia de *B. bronchiseptica* en humanos, con un claro aumento de su incidencia en dicho hospedador en los últimos años (125, 135, 363). A pesar de las diferencias presentadas respecto al rango de hospedadores y de la variedad en los síntomas de la enfermedad, se ha sugerido considerar a estos tres patógenos como subespecies de *B. bronchiseptica* con diferentes adaptaciones. Distintos métodos incluyendo hibridaciones ADN-ADN, comparación de las secuencias de ARN ribosomal 16S y 23S, de las subunidades β de la ARN polimerasa y de la girasa (GyrB), además de los genes involucrados en la virulencia, así lo demuestran (12, 259, 260, 364). De aquí en más mencionaremos a las tres especies en su conjunto como pertenecientes al grupo *B. bronchiseptica* como ha sido sugerido por otros autores (271, 248) o indistintamente como el grupo de las *Bordetellas* clásicas por ser las más estudiadas.

Los miembros del grupo *B. bronchiseptica* están muy cercanos entre si genéticamente, sin embargo se pueden observar diferencias entre los genomas que podrían indicar la manera en que se han diferenciado evolutivamente estas especies (325). Quizás el ejemplo más sorprendente se trate de la diferencia en los tamaños de los genomas de estas bacterias (Tabla I.4). Se ha determinado a través de electroforesis de campo pulsante y más recientemente mediante secuenciación que el genoma de *B. pertussis* es varios cientos de kilobases menor respecto al resto de los aislamientos del grupo *B. bronchiseptica* (271). Esto sugiere que la adaptación de *B. pertussis* a un único hospedador podría estar relacionado con esta gran reducción del tamaño de su genoma. La falta de material genético se podría correlacionar con los requerimientos más exigentes para el cultivo *in vitro* de *B. pertussis* y su sensibilidad aumentada a condiciones ambientales respecto al resto del género (78, 276, 313). Esta reducción, con la consecuente pérdida en la versatilidad metabólica, ya ha sido reportada para otras bacterias como *Rickettsia spp*, *Mycoplasma spp* y *Chlamydia spp* (9, 315).

El análisis de representación diferencial (RDA) ha arrojado diferencias entre los genomas que serían el resultado de transferencias de material genético de manera horizontal (246). Uno de los fragmentos presentes en *B. pertussis* y ausente en el resto del

género, está compuesto por una región de aproximadamente 5 kb que codifica para funciones metabólicas y de regulación (246). Dado que estos genes no se encuentran en ninguna de las bacterias del mismo género, se ha sugerido que se trataría de una isla metabólica adquirida por *B. pertussis* en algún momento de su evolución (121, 246). El locus que contiene los genes para la síntesis de la toxina pertussis (*ptxA-E*) y su sistema de secreción tipo IV (*ptlA-I*) posee algunas características presentes en islas de patogenicidad (10, 52). Este locus está flanqueado por un gen para ARN transferencia y algunas cepas de *B. bronchiseptica* han perdido el locus por completo, conservando los genes adyacentes (11). Por otro lado, el locus *wbm* en *B. bronchiseptica* y *B. paraptussis*, responsable de la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido de estas bacterias no está presente en el genoma de *B. pertussis* (246, 279). Este locus se encuentra reemplazado en *B. pertussis* por un elemento de inserción. Se ha sugerido que en el antecesor de *B. pertussis* habría ocurrido una integración de un elemento de inserción (IS) con la subsecuente recombinación con otra copia del mismo elemento, para llevar finalmente a la desaparición del locus *wbm*. Esto explicaría, como se detallará más adelante, la falta de este antígeno en *B. pertussis*.

Se espera que de la comparación entre las secuencias completas de los genomas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* se extraiga suficiente información para estimar si el proceso de adaptación de *B. pertussis* hacia un único hospedador fue debido a la adquisición de nuevo material genético de manera horizontal o si simplemente se trata de una variante de *B. bronchiseptica* que ha perdido parte del genoma.

Tabla I.4.. Principales características de las especies del género *Bordetella*.

	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella paraptussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. petrii</i>
Hospedador	Humanos	Humanos, oveja	Mamíferos, incluyendo al humano	¿Humanos?	Aves, humanos	Aves reptiles y	¿Humanos?	Desconocido
Enfermedad	Tos convulsa	Tos convulsa leve	Rinitis atrófica en credos, tos ferina en perros y gatos	Septicemia, enfermedad respiratoria	Septicemia	Enfermedad respiratoria en el pavo	Desconocido	Desconocido
Lugar de aislamiento en humanos	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	-	Heridas, infecciones de oído	-
Contenido G+C (% en moles)	66-68	66-68	66-68	61,5-62,3	65-67	62	64-65	63,8
Tamaño del genoma (kpb) ^a	3880-4060	>4400	>4400	ND	ND	ND	ND	ND
Crecimiento en agar MacConkey	-	+	+	-/+	+	+	+	ND
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	ND
Oxidasa	+	-	+	-	+	+	-	ND
Asimilación de Citrato	+	+	+	+	+	+	-	ND
Movilidad	-	-	+	ND	ND	+	ND	ND

En los últimos años, cinco nuevas especies han sido incluidas en el género *Bordetella*: *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. petrii* y *B. trematum* (Tabla I.4) (16, 344, 345, 356). *B.*

avium es el agente causal de enfermedad del tracto respiratorio de las aves de corral, especialmente de pavos. Estudios recientes también la describen como agente causal de infecciones en aves salvajes (284). Los análisis feno y genotípicos demuestran que *B. avium* es una especie relacionada pero en forma lejana con el resto del grupo *B. bronchiseptica*. Al igual que otras especies del género, *B. avium* sintetiza un set de factores de virulencia regulables por un sistema de traducción de señales de dos componentes y presenta un fuerte tropismo hacia el epitelio traqueal ciliado (16).

B. hinzii también se ha podido aislar del tracto respiratorio de aves de corral y en humanos en donde causaría septicemias (184) y ha sido aislada en pacientes inmunocomprometidos (69, 116, 117). *B. holmesii* se aisló de sangre de pacientes adultos jóvenes y ocasionalmente en esputos o en lavados nasofaríngeos. En algunos casos también se la ha asociado a síntomas coqueluchoides en humanos (233, 356, 331, 365). El primer aislamiento de *B. holmesii* se obtuvo en 1983 y a partir de ese momento el número de aislamientos ha ido aumentando considerándolo por ello como un patógeno emergente (233, 356).

B. petrii es el primer integrante del género *Bordetella* que no fue aislado a partir de una infección en humanos o en algún otro animal (348). Esta bacteria fue aislada de un biorreactor en condiciones anaerobias. La facultad de crecer en medios anaeróbicos presentada por *B. petrii* es interesante ya que introduce un punto de unión entre el grupo clásicamente aerobio de las *Bordetellas* y el presentado por las especies de *Achromobacter*, anaerobias facultativas, integrante del complejo AAB.

B. trematum es la especie que más recientemente se ha incorporado al género. Esta especie ha sido aislada de infecciones de oído o heridas en humanos, pero nunca a partir de infecciones del tracto respiratorio. Aún es poco lo que se conoce acerca de este patógeno (344).

A continuación haremos una descripción del estado de conocimiento de la infección causada por *B. bronchiseptica* ya que sobre esta especie desarrollamos nuestro trabajo. La elección de este modelo de estudio *B. bronchiseptica* – hospedador se basó en: :) que sobre esta especie, ahora también considerada patógeno del hombre, es menos lo que se conoce comparado con *B. pertussis* ::) que para ella existe una modelo natural de infección animal lo que facilita la interpretación de los resultados y ::) porque presenta un claro período de persistencia en el hospedador que molecularmente es poco conocido.

Ciclo infeccioso de *Bordetella bronchiseptica*

B. bronchiseptica al igual que las otras especies del género es un cocobacilo Gram negativo aerobio que no utiliza a los hidratos de carbono como fuente de carbono. Es la única especie que en determinadas condiciones ambientales es móvil. Esta bacteria produce enfermedades respiratorias en una gran variedad de animales domésticos y en ganado porcino pero se ha reportado también que este microorganismo puede causar infección en humanos (88, 244).

Al igual que otros patógenos, el proceso infeccioso de esta bacteria comienza con la colonización culminando en fenómenos de persistencia y/o diseminación a otros hospedadores. Esto es, la bacteria ingresa a las vías aéreas del hospedador mediante gotitas o aerosoles que contienen al patógeno y una vez dentro del mismo se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. Allí, las bacterias proliferan y luego se diseminan en el tracto respiratorio inferior. Se adhieren al epitelio ciliar y liberan toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio e inhibición de funciones de células del sistema inmune del hospedador. En el modelo murino de infección intranasal de *B. bronchiseptica*, se ha podido observar que el pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltrativas, predominando entre ellas los polimorfonucleares (131). Estos están distribuidos en todo el pulmón y en algunas áreas se presenta en franco proceso necrótico (131). Varios estudios indican que *B. bronchiseptica* es capaz de invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales y fagocíticas. En este medio intracelular quizás sea donde *B. bronchiseptica* persista y desarrolle la infección crónica característica de esta especie. A diferencia de las otras integrantes del grupo *B. bronchiseptica*, esta especie puede sobrevivir en medios acuosos indicando que dentro de su ciclo la transmisión hospedador – hospedador no es una vía obligada.

Para el desarrollo de cada una de las etapas de infección la bacteria requiere de una serie de factores muchos de los cuales ya han sido identificados y caracterizados. A continuación describiremos los aspectos más sobresalientes de cada uno de ellos.

Factores de virulencia involucrados en el proceso de patogénesis de *B. bronchiseptica*

El grupo de *B. bronchiseptica* expresa una serie de factores de virulencia comunes a todos los integrantes. Dentro de estos factores se encuentran las adhesinas tales como la hemaglutinina filamentosa (FHA), varios serotipos diferentes de fimbria (Fim) y diversas proteínas autotransportadoras como pertactina (PRN) y el factor de resistencia a la acción bactericida del suero (BrkA); y las toxinas tales como la adenilato ciclasa-hemolisina (Ac-Hly), toxina dermonecrótica (DNT) y citotóxina traqueal (TCT). *B. pertussis* expresa además otra toxina adicional, la toxina pertussis (PTX) que en las otras especies del grupo está ausente a pesar de contener los genes que codifican para esta toxina (226).

Como hemos mencionado más arriba la infección de *Bordetella* se inicia mediante un proceso de adhesión a los epitelios presentes en el tracto respiratorio del hospedador. En esta etapa están involucradas las siguientes adhesinas:

Adhesinas

Hemaglutinina filamentosa (FHA). Esta adhesina que es la más estudiada hasta el momento, es una proteína de 220 kDa de superficie pero que además se secreta al medio extracelular. Esta proteína es una de las primeras que se expresan a lo largo del proceso

de infección (306). Como su nombre lo sugiere posee una estructura filamentosa que consiste en el plegamiento de la cadena polipeptídica en una hélice dividida en tres partes. Las regiones C y N terminal de la cadena polipeptídica forman la cabeza de la hélice y el resto forman las otras dos regiones cuerpo y cola (223) (Fig. I.1).

A lo largo de su secuencia contiene diferentes dominios involucrados en el pegado a superficies del hospedador. El extremo de la estructura de hélice de FHA contiene un triplete Arginina – Glicina – Aspártico (RGD) que media la unión a receptores miembros de la familia de integrinas (168, 170, 301) caracterizados por contener un dominio glucosídico con afinidad por los glicolípidos que llevan lactosa (278, 289). Estos receptores están presentes en las membranas ciliadas del epitelio respiratorio y en los macrófagos alveolares (49). A través de esta región FHA estaría también involucrada en la formación inicial de un complejo formado por la integrina LRI y su proteína asociada CD47 junto al receptor de complemento tipo 3 (CR3) presentes en la membrana del leucocito (169, 288, 305). La formación de este complejo permitiría a *Bordetella* entrar a la célula para establecerse en el medio intracelular. Este tipo de adhesión específica brindaría la posibilidad de una liberación controlada y acotada de las toxinas capaces de limitar de alguna manera la acción de los macrófagos (305, 320). Otro dominio responsable de la adhesión a carbohidratos (CRD), se encuentra entre los residuos 1141 y 1279, con una afinidad particular por los glicolípidos. Esta proteína puede unirse además a glicolípidos sulfatados no cargados (239). La región responsable de esta actividad se encuentra en la parte amino terminal de la proteína y es también la responsable de la actividad hemaglutinante de FHA (144).

Por último, FHA se une a la proteína del suero, la proteína C4BP que es conocida como un regulador de la activación del suero inhibiendo la vía clásica del complemento (29). La manera en que *Bordetella* utiliza esta unión es aún desconocida, pero demuestra una vez más la complejidad de la interacción de esta bacteria con el sistema inmune del hospedador.

La liberación de FHA al medio extracelular parece estar mediada por la presencia de una proteasa de membrana denominada SphB1 perteneciente a la superfamilia de las subtilisinas (82). Se ha observado que bacterias deficientes en la expresión de SphB1 no liberan FHA al medio extracelular, aunque sí se detecta la presencia de estructuras pertenecientes a FHA en la membrana (82). La actividad de SphB1 parece ser indispensable para que el proceso infeccioso tenga lugar ya que esta proteasa permitiría regular el proceso de adhesión permitiendo a la bacteria desadherirse para colonizar otras zonas del epitelio (81). La regulación a nivel transcripcional ocurre de manera coordinada a la de *fhaB* (10, 216) que codifica para el precursor FhaB (367 kDa) de la forma activa de FHA.

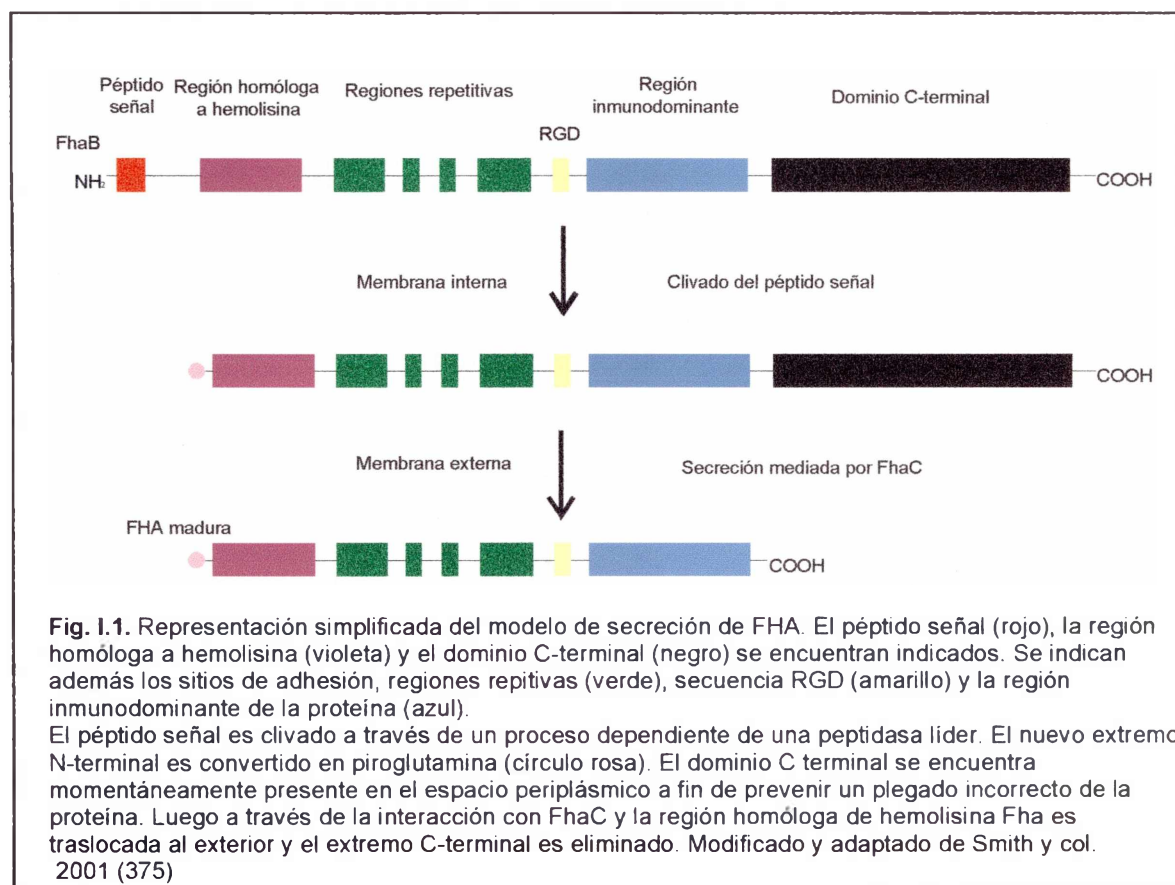
La forma activa corresponde a las dos terceras partes del extremo N terminal de FhaB. (89,289). Es en este extremo en donde se encuentra una región de 115 aminoácidos requeridas para su secreción que posee homología con regiones de las hemolisinas presentes en otras bacteria tales como *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis* (89). La secreción de estas proteínas requiere de la presencia de otra proteína accesoria que en el

caso de *Bordetella* ha sido identificada como FhaC. Su estructura consiste en 19 hojas beta plegadas de forma tal de presentar una estructura de barril que atraviesa la membrana externa (130, 173). FhaC presenta homología con una proteína de membrana de *H. influenzae*, HMWB cuya función es de facilitar la exportación de la adhesina HMWA (21). Los precursores de FHA y HMWA poseen una región homóloga de 22 aminoácidos, seguidos de una región catiónica y un fragmento hidrofóbico. Esta región actuaría como un péptido señal de inusual tamaño (71 aminoácidos) (172) que es removido a partir de un sitio consenso para la peptidasa de región líder (Lep) lo cual sugiere una secreción de FHA sec dependiente (202). Si bien el tercio C-terminal no parece estar asociado con la proteína en su forma extracelular, resulta ser imprescindible para su producción (290). La secuencia aminoacídica de esta región contiene una zona rica en prolina similar a la presente en los dominios C-terminales de las proteínas de membrana externa de bacterias Gram positivas como la proteína M de streptococos (93). En estos casos se especula que es ésta la región responsable de anclar a la proteína a la capa de peptidoglicano. Posiblemente esta porción de FhaB que es removida actúe como chaperona, estabilizando la proteína y permitiendo el correcto plegado para ser reconocida por el sistema de secreción (290).

El modelo actual de maduración y secreción involucra al precursor FhaB que es translocado al espacio periplásmico, probablemente utilizando la peptidasa líder y la maquinaria sec. Luego, el residuo homólogo con hemolisinas interactuaría con FhaC. Una vez que el extremo N-terminal atravesó el barril- β de FhaC el extremo C-terminal es clivado para poder así liberar finalmente la molécula de FHA madura que se plegará en la estructura de horquilla propuesta por Makhov y colaboradores (1994) (223) (Fig. I.1).

El estudio del rol de FHA en el desarrollo de la patogénesis de *Bordetella* se ha enfocado principalmente en su actividad como adhesina. Sin embargo, la posibilidad de que posea otras actividades importantes es un punto que se está explorando actualmente dada la amplia variedad de dominios presentes en su estructura. Es así como se ha descrito recientemente que FHA en forma purificada es capaz de estimular la liberación de IL-10, IL-6 y TNF- α en macrófagos (234) y de inducir un franco proceso apoptótico en monocitos, probablemente a través de TNFR1, uno de los receptores de TNF- α (1). Finalmente, se ha sugerido también un rol de FHA durante el proceso de persistencia en el hospedador. La respuesta humoral lograda en las infecciones con mutantes defectivos de FHA es significativamente superior a la observada durante la infección con la cepa salvaje (79). Esta posible actividad inhibitoria de la respuesta inmune por parte de FHA podría permitir resistir los mecanismos de defensa presentes en el hospedador.

El destacado rol de FHA en la adhesión a células epiteliales y macrófagos y la respuesta que ésta desarrolla en estos últimos marcan a esta proteína como un importante factor de virulencia involucrado en establecimiento de la infección. La diversidad de dominios presentes a lo largo de la estructura de FHA permite predecir además una multiplicidad de funciones para esta proteína, quedando aún por dilucidar la mayoría de ellas.



Pertactina (PRN). *Bordetella* expresa proteínas asociadas con la superficie celular que dirigen su propia exportación a la membrana externa, en donde se autoprocésan a través de un mecanismo proteolítico sobre su extremo C-terminal. Este mecanismo es similar al utilizado por la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* y por la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa* (185, 277). La primera proteína caracterizada dentro de este tipo de proteínas en *Bordetella* fue la pertactina (PRN). Esta proteína en su forma madura tiene un peso molecular de 68 kDa en *B. bronchiseptica* (249), 69 kDa en *B. pertussis* (61) y de 70 kDa en *B. parapertussis* (211). La estructura determinada por cristalografía sugiere la existencia de 16 cadenas beta paralelas con una sección en forma de V, siendo en su conjunto la mayor estructura beta conocida hasta el momento (97).

La pertactina es transcripta a partir del gen *pm* que codifica para un polipéptido de 93.5 kDa (61). Este precursor denominado p93, es procesado eliminando un péptido señal de 34 aminoácidos del extremo N-terminal (224) y un polipéptido de 30 kDa (p30) del extremo C-terminal. Si bien el rol de p30 no ha sido determinado, es detectado en la membrana externa de la bacteria y se sugiere que estaría involucrado en el mecanismo de secreción de pertactina (59). La secuencia del gen *pm* en las diferentes especies presenta una gran homología entre sí siendo la porción correspondiente a p30 la más conservada, indicando una función relevante de esta porción (210).

Otras proteínas con propiedades de autoexportación presentes en *Bordetella* incluyen al factor de colonización traqueal (TcfA) (109), al factor de resistencia al suero (BrkA) (103) y Vag8 (108). Todas ellas, junto a PRN presentan homologías en su extremo C-terminal y poseen, al igual que FHA, repeticiones de la secuencia Arginina-Glicina-Aspártico (RGD).

La habilidad de PRN para funcionar como adhesina ha sido evaluada *in vitro* como *in vivo* (23, 98, 207, 294). Así, la proteína expresada en cepas de *Salmonella* pueden incrementar la adhesión de la bacteria (98) o la adición de la proteína purificada a cultivos de células puede inducir el pegado de las mismas a las placas de cultivo. Sin embargo existen datos contrapuestos a estos resultados que muestran que mutantes defectivos en la expresión de PRN (*B. pertussis* PRN⁻) no presentan alteraciones en la cinética de colonización en los ensayos de infección *in vivo* (294). Esto puede deberse en parte a que como hemos mencionado anteriormente la pertactina no es la única adhesina por lo que su deficiencia se ve sobrepuesta por otras adhesinas como lo son la FHA o las fimbrias.

El estudio de esta proteína no se ha centrado sólo sobre su capacidad de actuar como adhesina sino también sobre su poderosa acción inductora de la respuesta inmune (61, 249, 261). Esta particularidad ha permitido que PRN haya sido utilizada como antígeno vacunal (314). El hecho de que esta proteína presente regiones polimórficas ha dirigido la atención de numerosas investigaciones hacia la relevancia de los mismos en la protección (45, 57, 114, 190, 251). Estos trabajos han revelado una divergencia entre las bacterias circulantes en la población y las cepas vacunales hoy en uso (251, 254). Estas divergencias parecerían ser una de las causas del aumento de incidencia de *Bordetella* que viene registrándose desde hace varios años en diferentes países, incluyendo a la Argentina tal como lo ha descripto nuestro grupo (107).

Otras proteínas autotransportadoras: BrkA, TcfA y Vag8. Las proteínas autotransportadoras constituyen una familia compuesta por proteínas que son exportadas al exterior de la célula por un mismo mecanismo pero cuyas funciones pueden ser tan diversas como adhesinas, proteasas, proteínas con actividad protectora frente a la respuesta del hospedador, etc (151, 219). Como ejemplos de esta familia podemos citar a la proteasa de inmunoglobulina A de *Neisseria gonorrhoeae* (193) y *Haemophilus influenzae* (277), la citotoxina vacuolante, VacA, de *Helicobacter pylori* (83), IcsA de *Shigella flexneri*, involucrada en la reorganización de la polimerización de actina de la célula eucariota (328), EspP, serin proteasa extracelular de *E. coli*, el factor de colonización traqueal (111), pertactina (59) y la proteína de resistencia al suero, BrkA (103), de *B. pertussis*.

Todas estas proteínas poseen las siguientes características comunes: :) son sintetizadas como un polipéptido más grande que sufre un proceso proteolítico liberando un extremo C-terminal de 30 KDa, ::) el dominio C-terminal de la proteína en la membrana externa de la bacteria forma barriles de hoja β -plegada y :::) para la exportación de la proteína autotransportadora no se requiere de proteínas accesorias y de allí el nombre de esta familia de proteínas.

El modelo de secreción propuesto sugiere que la secuencia consenso presente en el extremo N-terminal permite la translocación a través de la membrana citoplasmática. Una vez en el periplasma, la proteína es clivada y el extremo C-terminal se inserta en la membrana externa donde forma un poro por donde el extremo N-terminal es exportado en forma de rulo. La proteólisis de este extremo N-terminal se produce una vez que haya pasado a través del poro de manera autoproteolítica o gracias a la presencia de otra proteasa.

En *Bordetella* la proteína BrkA cumple la función de impedir la acción bactericida del suero nativo del hospedador (103, 104). La relevancia que esta protección posee durante un proceso infeccioso *in vivo* es aún discutida ya que se ha observado *in vitro* que *B. pertussis* no es capaz de resistir la acción bactericida del suero aún en presencia de esta proteína autotransportada (145).

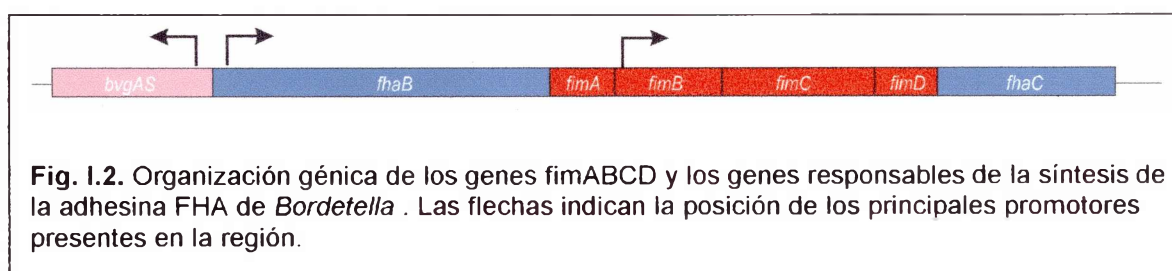
Las tres principales especies de *Bordetella* expresan la proteína Vag8 de 95 kDa. Al igual que todas las proteínas autotransportadoras descritas hasta el momento en *Bordetella* presenta el motivo RGD involucrado en procesos de adhesión (108). La evaluación de mutantes defectivos en Vag8 en el proceso de infección en modelos murinos han arrojado resultados contradictorios según la construcción genética empleada. Mientras que una inserción con un transposón en el gen *vag8* genera un mutante con dificultades de colonización, la delección de una porción interna del gen no induce diferencias significativas respecto a la cepa parental (108). Este aspecto aún no se ha esclarecido.

El factor de colonización traqueal (Tcf) es expresado únicamente por *B. pertussis*. La ausencia de esta proteína previamente denominada *vag34* (110) produce una disminución en la colonización y persistencia de la bacteria en la tráquea del animal sin presentar diferencias con la cepa parental en el pulmón (111).

Hasta el momento se dispone de escasa bibliografía acerca de los roles que presentan cada una de las proteínas autotransportadas BrkA, Tcf y Vag8. Por lo tanto es necesaria una profundización de la investigación de estos factores a fin de determinar la relevancia que presenta la presencia de estas proteínas en el proceso de patogénesis de *Bordetella*.

Fimbrias (Fim). Al igual que la mayoría de las bacterias Gram negativas, *Bordetella* expresa proteínas en la superficie celular llamadas fimbrias (Fim). Las dos principales subunidades que forman los dos serotipos dominantes dentro del género, Fim2 y Fim3 están codificadas en locus no relacionados entre sí: *fim2* y *fim3* (213, 235). Existe otro locus, *fimX*, que es expresado sólo en bajos niveles y recientemente, fue identificado un nuevo locus *fimN* en *B. bronchiseptica* (178, 291). Estos genes se encuentran dispersos en el cromosoma de la bacteria y presentan entre un 57 y 60% de homología entre sí en su secuencia de aminoácidos (40, 86). La regulación de la expresión de los genes *fim* está mediada por una región rica en citosina presente entre las posiciones -10 y -35 produciendo corrimientos de los marcos de lectura (178, 358). A partir de este corrimiento se producen alteraciones en la expresión que llevan a variaciones de fase entre

cualquiera de los subtipos. Sin embargo, todas comparten una subunidad en común, FimD, la cual estaría involucrada en el proceso de adhesión de la bacteria a células epiteliales y monocitos (147). Si bien los genes *fim* no se encuentran relacionados entre sí, las proteínas son ensambladas y secretadas a través de un mismo sistema codificado por el locus *fimBCD* (359). Este operón se encuentra intercalado dentro del responsable de la expresión de otra adhesina, FHA (Fig. I.2) (359). Más aún tanto *fimBCD* como *fhaC* se encuentran sometidos a la acción del promotor de *fimB* y son transcritos en forma acoplada (218). Los productos de *fimBCD* presentan similitudes con los productos de los genes *pap* de *E. coli*, involucrados en la producción del pili de esta bacteria (167). A partir de esta similitud se han predicho los roles para cada uno de los productos de los genes *fimBCD*. FimB es semejante a PapD, chaperona responsable de evitar la degradación de la fimbrias en el espacio periplásmico. Al igual que PapC, FimC sería la responsable de permitir el transporte de las subunidades de la fimbria a través de la membrana y participaría del posterior anclaje a la misma (359). Finalmente, en *Bordetella*, FimD ha sido propuesta como el capuchón adhesivo de la estructura (122).



Se ha observado que las mutaciones realizadas sobre cualesquiera de los genes *fimBCD* generan una bacteria con ausencia completa de fimbrias. Estos mutantes han sido utilizados para el estudio del rol de las fimbrias en la infección (232) y como ocurre en la mayoría de los procesos de patogénesis bacteriana las fimbrias median la adhesión al epitelio del hospedador. Además estos mutantes defectivos en la expresión de fimbrias, *B. pertussis* Fim⁻ y *B. bronchiseptica* Fim⁻, presentan deficiencias en su habilidad para multiplicarse y persistir en la nasofaringe y tráquea del hospedador tanto en modelos murinos como en ratas (122, 232, 252). Más aún, el perfil de anticuerpos generados como respuesta de la infección causada en ausencia de fimbrias es cualitativamente diferente y cuantitativamente superior a la presente durante la infección en presencia de esta adhesina (232). Estos resultados sugieren que las interacciones mediadas por fimbrias tanto con células epiteliales como con monocitos o macrófagos podrían poseer roles importantes no solo en los procesos de adhesión sino también en la inmunomodulación de la respuesta del hospedador.

Toxinas.

Una vez establecidas las interacciones adhesinas-receptor específicas, las bacterias patógenas inducen lesiones y tratan de evadir en todo momento la respuesta

desarrollada por el hospedador. Para ello *Bordetella*, al igual que otros patógenos Gram negativos, sintetiza una serie de toxinas. Éstas son liberadas en el espacio extracelular que se ubica entre la bacteria adherida y la superficie eucariota, por lo que la efectividad en cuanto al número de moléculas de toxinas liberadas que llegan al blanco es alta.

A continuación se describirán las principales toxinas sintetizadas por las diferentes especies del grupo *B. bronchiseptica*.

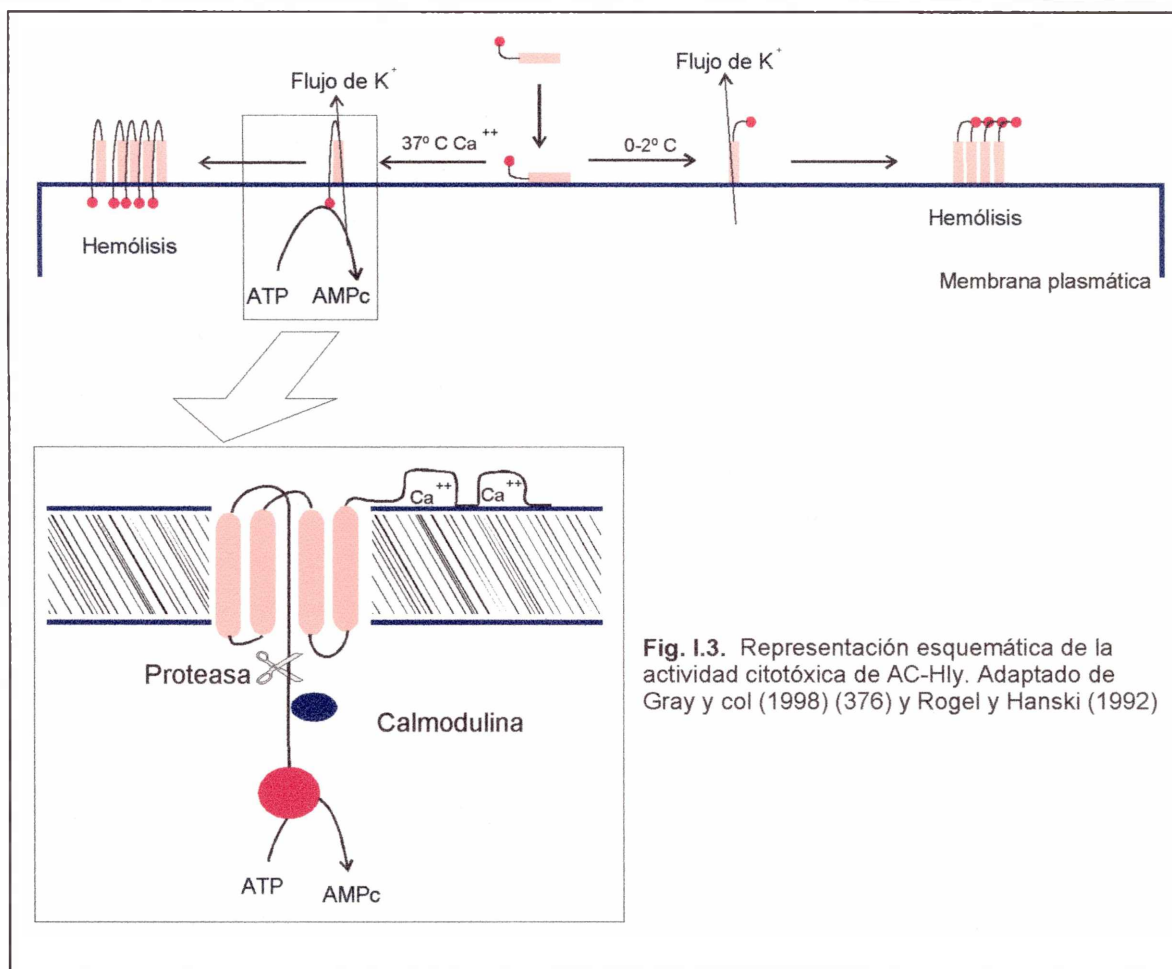
Adenilato ciclasa–Hemolisina (AC-Hly). Esta enzima de 1706 aminoácidos (123) con un peso molecular que oscila entre 175 y 220 kDa (120) fue identificada hace aproximadamente 20 años. Se caracteriza por ser sintetizada y secretada sólo en el estado virulento de la bacteria (ver más abajo) y por ello es considerada un marcador de la existencia de dicho estado. Esta proteína es capaz de entrar a la célula eucariota en donde luego de ser activada por calmodulina, cataliza la síntesis de AMP_c, que termina alterando la fisiología normal de la célula (248). El gen codificante para la toxina adenilato ciclasa - hemolisina (*cyaA*) forma parte de un operón, junto con los genes cuyos productos están involucrados en la secreción de la toxina (*cyaBDE*) y un gen involucrado en la activación de la toxina, *cyaC* (123, 124, 201). Este último gen causa una modificación postraducciona de la AC-Hly, más específicamente cataliza la adición de un residuo del ácido palmítico en la Lys₉₈₃ de la cadena peptídica (22, 141). La AC-Hly es una proteína bifuncional perteneciente a la familia RTX (repetición en toxina) que incluye también la α hemolisina de *Escherichia coli* y a otras hemolisinas y leucotoxinas de varios patógenos Gram negativos incluyendo a *Pasteurella haemolytica* y *Actinobacillus spp*. Tanto la actividad hemolítica como la de ciclasa son esenciales para el inicio de la infección de *Bordetella* (133, 188). Se ha observado que bacterias deficientes en la expresión de AC-Hly se presentan como avirulentas (352) en el modelo de infección *in vivo*. Más aún, las inmunizaciones tanto activas como pasivas, con la proteína purificada como con anticuerpos anti-AC-Hly acortan significativamente los períodos de colonización de *B. pertussis* en el tracto respiratorio del ratón (138).

La actividad adenilato ciclasa está localizada en los primeros 400 aminoácidos en el extremo amino terminal y es activada por calmodulina (123, 200). Si bien la alta afinidad de esta proteína por la calmodulina hacía pensar que esta molécula estaba involucrada en la translocación de esta toxina dentro de la célula eucariota, evidencias recientes descartan esta posibilidad (153). La calmodulina es sin embargo, crucial para que la enzima, una vez dentro de la célula, incremente su actividad hasta 100 veces catalizando la formación de AMP_c en valores por arriba de los fisiológicos (127, 248). El sitio catalítico adenil ciclasa consiste en dos subdominios, T25 y T18 que pueden ser obtenidos *in vitro* con una proteólisis controlada (199). Ambos fragmentos pueden asociarse con calmodulina en un complejo ternario activo. T25 (residuos 1-224) lleva el sitio catalítico, mientras que T18 (residuos 225-399) poseen el sitio de unión a calmodulina (248).

El dominio hemolisina (residuos 400-1706) posee actividad hemolítica como resultado de su habilidad para formar canales selectivos en las membranas. Más importante aún, es el hecho de que este dominio media el pegado y posterior internalización de la toxina

dentro de la célula eucariota (296). Se pueden identificar diferentes subregiones dentro de este dominio: 1) una región formadora del poro con cuatro aminoácidos hidrofóbicos; 2) una región en donde es adicionado un residuo de ácido graso; 3) 38-42 copias del glicina-aspartato, nonapéptido característico de las toxinas RTX, siendo éste el dominio de pegado a Ca^{+2} de la proteína y 4) el péptido señal de secreción sin procesar (248).

La invasión de la célula huésped por parte de adenilato ciclasa-hemolisina no ocurre a través de una vía endocítica mediada por receptores (126) si no que utiliza un sistema especializado, dependiente de calcio y temperatura, que aún no es del todo comprendido (295). La AC-Hly puede interaccionar con una variedad de células y una vez en el citoplasma de las mismas luego de unirse a la calmodulina produce altos niveles de AMP_c . La AC-Hly presenta la particularidad, respecto a otras toxinas presentes en bacterias o en plantas, de presentar un mecanismo propio de ingreso a célula eucariota. El dominio catalítico parece ser translocado directamente a través de la membrana plasmática hacia el citosol por un proceso conocido como internalización o intoxicación. Existen varias evidencias que soportan este tipo de mecanismo. Primero, el inicio de la intoxicación es rápida, pudiéndose detectar un aumento en los niveles de AMP_c segundos después de agregar AC-Hly. En cambio el ingreso de proteínas a las células a través de endocitosis requieren tiempos de exposición más prolongados. Segundo, la entrada es independiente de la acidificación de las vesículas endocíticas. Finalmente, AC-Hly puede invadir células con poco tráfico en las membranas como los eritrocitos humanos (248, 295). El mecanismo molecular que lleva a la internalización de la proteína consistiría en un proceso de dos pasos (Fig. I.3). En el primero, la AC-Hly se une a la superficie celular, posiblemente a través de los gangliósidos presentes en la superficie de la célula eucariota. Esto requiere la integridad de la región C-terminal y de la palmitoilización de AC-Hly. La unión de la toxina a eritrocitos producirán eventualmente lisis, debida a la capacidad de la proteína a formar poros. La inserción del monómero de AC-Hly permite la salida de K^+ a través de un proceso que es necesario para la posterior oligomerización de la toxina responsable de la actividad hemolítica presente en eritrocitos de camero. El segundo paso involucra la aglutinación de los monómeros y la posterior translocación del dominio catalítico de la AC-Hly a través de la membrana plasmática de la célula. Este proceso es dependiente de la temperatura (sólo ocurre a temperaturas por encima de 15°C), del potencial de membrana de la célula blanco y de la presencia en cantidades milimolares de iones calcio (248, 269, 295). La región rica en glicina y aspartato podrían estar directamente involucrados en este proceso de translocación dependiente de calcio, ya que ésta región posee una alta afinidad por estos iones y presenta cambios conformacionales al producirse la unión del ión (296). Se ha demostrado recientemente que la carga electrostática de los residuos 224-242 de AC-Hly es crítica para su translocación dentro de la célula (180). Estos resultados junto a los obtenidos por otros autores sugieren que el campo eléctrico a través de la membrana es la fuerza impulsora utilizada para entrar a las células blanco (269).



En cuanto a la capacidad protectora de esta proteína se ha observado en modelos animales que la inmunización con AC-Hly protege en modelos animales contra la colonización (136, 138, 262). AC-Hly parece estar involucrada en la modulación de la respuesta inmune una vez establecida la primera etapa de colonización. Harvill y colaboradores (1999) (195) han mostrado mediante ensayos *in vivo* de diferentes cepas de ratones con deficiencias en distintos componentes del sistema inmune, que la AC-Hly de *B. bronchiseptica* estaría involucrada en la evasión de la respuesta inmune del tipo innata, sobretodo aquella relacionada con los neutrófilos. Esta particularidad explicaría el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón de animales infectados (186, 145). En estos mismos estudios se ha descrito además una actividad proapoptótica de esta toxina principalmente en células fagocíticas. Su rol en el desarrollo del proceso apoptótico de las células eucariotas ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* en numerosas líneas celulares (134, 187, 189). Este ha sido propuesto como uno de los mecanismos desarrollados por *Bordetella* para escapar de la acción antibacteriana de los macrófagos (132). Sin embargo queda aún por esclarecer la importancia que presenta la inducción de la muerte celular programada de las células del huésped durante el desarrollo de la infección.

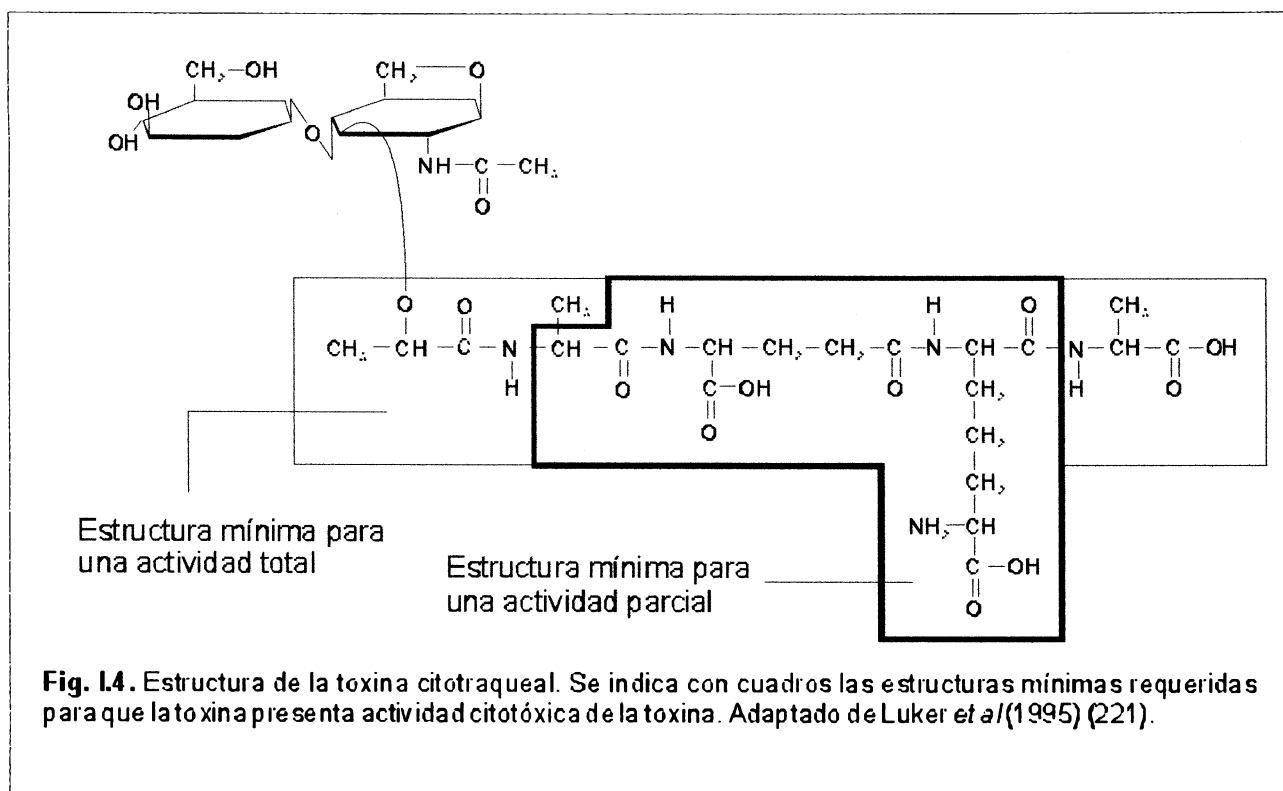
Toxina dermonecrótica (TDN). A pesar de que esta toxina ha sido descrita hace muchos años (39), la misma no ha sido estudiada con igual intensidad que el resto de los

factores de virulencia de *Bordetella* quizás como consecuencia de las dificultades que existen para su purificación (bajo niveles de síntesis y localización citoplasmática). Su nombre deriva de las lesiones necróticas que se producen al inocular la toxina de manera subcutánea en un ratón (214). La toxina es producida por las diferentes especies del grupo *B. bronchiseptica* y no es secretada al medio extracelular, siendo su ubicación citoplasmática (84).

El gen que codifica para la TDN de *B. pertussis* fue clonado y secuenciado (4,4 Kpb) (349). La toxina puede ser ubicada a través de la homología de su secuencia y su actividad dentro de la familia integrada por la toxina necrosante de *E. coli*, la toxina C3 botulínica y la toxina de *Pasteurella multocida* (100, 162, 267, 299). Todas estas toxinas inducen un aumento de la replicación del ADN celular, de la síntesis proteica y del ensamblaje de las fibras de actina, dando como resultado un aumento en la división celular junto a la presencia de células multinucleares (158, 159). Mientras que la porción N-terminal de esta toxina se encuentra involucrada en la unión a un receptor aún desconocido en la célula eucariota (231), la porción C-terminal de TDN desamida un residuo de glutamina de GTPasas como la proteína Rho y cataliza la transglutaminación de ésta y otras GTPasas (310), utilizando en este último caso a lisina y poliaminas como sustrato (310, 311). Las GTPasas Rho, Rac y Cdc42 son reguladores de la reorganización del citoesqueleto de actina (230). La TDN modifica entonces los procesos de migración, morfogénesis y fagocitosis de la célula eucariota (143) a través de mantener las GTPasas en su forma activa permanentemente impidiendo que se hidrolice el GTP (230).

A pesar de ser considerada un factor de virulencia, mutantes defectivos en la expresión de esta toxina no presentan diferencias con la cepa parental en ensayos de infección en modelos murinos. Recientemente se observó que sólo las cepas de *B. bronchiseptica* productoras de TDN eran capaces de producir neumonía y atrofia nasal en cerdos (50).

Toxina citotraqueal (TCT). Se trata de un disacárido unido a un tetrapéptido derivado de la pared de peptidoglicano. Tanto estructural como funcionalmente pertenece a la familia de muramilpéptidos (Fig. I.4). Las bacterias Gram negativas producen una capa de peptidoglicano, sin embargo sólo la liberación de fragmentos de esta estructura durante la fase exponencial de crecimiento ha sido descrita en *Bordetella* y *Neisseria gonorrhoeae* (69,317). La destrucción de las células ciliadas por parte de esta toxina produce un tos persistente, necesaria para eliminar el mucus, lo cual es normalmente función de las cilias. Se ha demostrado empleando células derivadas de tráquea de hamster, que mientras la porción glucídica de TCT es irrelevante para la actividad tóxica (220), si lo es la presencia de una porción peptídica que contiene ácido diaminopimélico (221). El mecanismo de toxicidad es indirecto y ocurre a través de la inducción de un aumento en la producción de IL-1 (150) que activa a la óxido nítrico sintasa, produciendo grandes cantidades de radicales NO (149). Estos radicales destruyen enzimas dependientes de iones y eventualmente inhibe la función mitocondrial y la replicación del ADN de las células que se encuentran en contacto con la bacteria (150).



Las especies del grupo *Bordetella* y *N. gonorrhoeae* producen a diferencia de otras bacterias cantidades importantes de fragmentos del peptidoglicano. Esta sobreproducción de TCT por parte de *Bordetella* sería suficiente para causar un aumento desmesurado de NO que llevaría a la destrucción de la misma célula eucariota (112). En el caso de *Bordetella* el beneficio es evidente, la inducción de tos a través de este mecanismo provee de una vía eficiente de propagación entre hospedadores. El tracto respiratorio inferior es un ambiente normalmente estéril, por lo que la presencia de fragmentos de peptidoglicano indicaría que se está produciendo una infección bacteriana. Este sistema de alarma sería apropiado para detectar la presencia de bacterias ya que en su mayoría presentan estructuras peptidoglicanas.

Toxina pertussis (PTX). Dentro del género *Bordetella*, *B. pertussis* es la única que produce esta toxina. El operón se encuentra en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, sin embargo, una cantidad importante de mutaciones en la región promotora en estos genes genera su silenciamiento en estas especies (12). Dentro de las toxinas de naturaleza proteica, PTX es la más compleja ya que está formada por 6 subunidades totales pero por cinco subunidades diferentes S1 a S5. El peso molecular total es de 106 kDa (330). Cada una de las subunidades que conforman la proteína es transportada a la membrana interna por un mecanismo sec dependiente. Una vez clivado el péptido señal la toxina es ensamblada en el espacio periplásmico y transportada a través de la membrana externa por un sistema de secreción tipo IV (52, 102). Este sistema involucra nueve proteínas accesorias (PtlA-I) (101, 353) homólogas a proteínas involucradas en exportación de proteínas y/o ADN, siendo el sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* el más descrito hasta el momento. A su vez se ha reportado recientemente que la secreción de PTX al

medio extracelular es dependiente de la presencia de glutatión reducido durante el crecimiento *in vitro* (322).

Esta toxina pertenece a la familia de las toxinas A-B que incluye a toxinas ADP-ribosilantes entre las que se pueden citar a la toxina diftérica, la toxina colérica, la exotoxina A de *Pseudomonas* y la enterotoxina de *E. coli* (209, 215, 256). La porción B, compuesta por las subunidades S2, S3, S4 y S5 en una proporción 1:1:2:1 respectivamente, es la responsable de la unión de la toxina a las células blanco. El mecanismo de unión a las células linfocitarias sería compartido en algunos aspectos con el utilizado por el virus VIH-1, ya que esta porción es capaz de inhibir la entrada y replicación del virus en estas células (3). La parte A está compuesta sólo por la subunidad S1 y es responsable de la ADP-ribosilación de proteínas G inhibitoria (217, 330).

Luego del proceso de adhesión, la porción A de la toxina es traslocada al citosol de la célula blanco. Una vez allí, la subunidad S1 expresa su actividad ribosilante utilizando NAD^+ como donador de ribosil-ADP y a proteínas G como aceptores (217). Estas proteínas ribosiladas pierden su actividad. Estas proteínas son G_i , G_t (transductina) y G_o . En su forma activa G_i inhibe a la adenilato ciclase y activa canales de potasio, G_t activa la GMP_c fosfodiesterasa y G_o activa canales de potasio, inactiva canales de calcio y activa fosfolipasa C- β . Los efectos bioquímicos que se suceden como resultado de la ADP ribosilación de las distintas proteínas G incluyen hipersecreción de insulina, liberación de ácidos grasos, inhibición de la quimiotaxis, respuesta oxidativa y liberación del contenido lisosomal en neutrófilos y macrófagos (36, 46, 47, 235, 319). También es capaz de estimular la síntesis y secreción de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 y IL-6 (333). Esta toxina ha sido descrita también como adhesina frente a macrófagos humanos y a células epiteliales de tracto respiratorio (335). El proceso de adhesión se produciría a través de dominios que reconocerían carbohidratos presentes en las subunidades S2 y S3 (346). Esta función sería redundante con la que cumplen otras adhesinas como FHA por lo que se ha sugerido que su posible actividad adhesiva es redundante. Sin embargo, en ensayos *in vivo* han demostrado que para que se produzca la redundancia entre ambos factores, PTX y FHA, es necesaria la actividad enzimática de PTX y no la actividad adhesiva observada *in vitro* (7). Esto indicaría que existe más bien una complementación entre la actividad adhesiva de FHA y la actividad enzimática de PTX.

La infección causada por *B. pertussis* ha sido considerada muchas veces como una infección mediada por PTX. Es decir que esta toxina sería la principal responsable de la mayoría de la sintomatología de esta enfermedad (275).

Lipopolisacárido (LPS). El lipopolisacárido (LPS) ha sido considerado como la endotoxina por excelencia de las bacterias Gram negativas. Sus efectos han sido estudiados con cierto detalle a fin de poder prevenir farmacológicamente los diversos efectos que produce su presencia en el hospedador (340).

El LPS constituye el componente estructural mayoritario de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. La fracción de LPS representa entre un 10-15% del total de moléculas presentes en la membrana externa y se estima que ocupa un 75% de la

superficie de la bacteria. Se trata de moléculas anfífilas con una composición que varía entre e intra especies. Está compuesto por el lípido A por el que se inserta en la membrana plasmática externa de la bacteria, un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O y uniendo ambas partes se encuentra un hetero-oligosacárido no repetitivo conocido como core o núcleo.

El lípido A es el componente lipídico que representa la parte hidrofóbica del LPS. Esta parte del LPS posee una estructura altamente conservada y es la responsable de la mayoría de las patologías severas asociadas a infecciones producidas por bacterias Gram negativas. En *Escherichia coli* el lípido A está formado por un disacárido de D-glucosamina con seis residuos de ácidos grasos y dos grupos fosfato (283). El número de sustituciones de ácidos grasos parecer estar en relación directa con la capacidad de inducir la respuesta inflamatoria. Las moléculas de LPS con cinco cadenas acilo no inducen inflamación, pudiendo actuar incluso como antagonistas (19).

El core o núcleo del LPS es una cadena corta de azúcares que puede ser dividido en núcleo interno y externo (266). La parte interna está compuesta por un azúcar muy poco común, el ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO), un número variable de L-glicero-D-mano-heptosas y en general ambos azúcares pueden estar sustituidos con grupos fosfatos, pirofosfato, sulfato y/o etanolamina (293). Las moléculas de Kdo son exclusivas de la estructura del LPS por lo que su cuantificación se utiliza para determinar las cantidades de LPS (181). Este azúcar se encuentra unido directamente al lípido A y junto a 3-6 monosacáridos más conforman el núcleo interno del LPS. Las características principales de esta parte del núcleo dentro de las Enterobacterias se encuentran conservadas, quizás reflejando un posible rol de esta porción en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana externa (148). El núcleo externo es la región en donde se une el antígeno O y es una región compuesta por hexosas. Esta parte, al contrario de la parte interna, presenta una mayor variabilidad dando como resultado en *E. coli* cinco serotipos denominados: R1, R2, R3, R4 y K-12 (292).

El antígeno O se encuentra unido al núcleo y se extiende hacia el exterior. Su composición consiste en unidades repetitivas de oligosacáridos de uno a cinco monosacáridos. El largo de las cadenas puede ser muy variable, llegando a encontrarse 40 repeticiones del monómero. Esta porción es mucho más larga que el core y representa la parte hidrofílica del LPS. Se conocen hasta 20 azúcares diferentes en la composición del antígeno O. En su mayoría se trata de dideoxihexosas como abeciosa, colitosa, paratosa y tivelosa las cuales es difícil encontrar en otra estructura bacteriana. Las variantes estructurales del antígeno O contribuyen a la presencia de diferentes serotipos entre diferentes especies e incluso dentro de la misma especie llegando a describirse alrededor de 170 variantes diferentes de antígeno O sólo en *Escherichia coli*.

La síntesis del LPS ha sido descrita casi en su totalidad en algunas Enterobacterias y en otras bacterias Gram negativas (312). En general se trata de una síntesis de diferentes partes del LPS en etapas que luego son unidas de manera sucesiva. Así, es sintetizada por un lado toda la porción del lípido A y de manera separada el core. Este último es sintetizado sobre una proteína de membrana interna para luego ser transferido al lípido A

previamente sintetizado. Durante la síntesis del antígeno O los monómeros no son agregados directamente sobre una estructura creciente de LPS, sino sobre un lípido carrier. Una vez completo el antígeno O es transferido y unido de manera covalente a una molécula ya formada de lípido A-core, presente en la cara periplasmática de la membrana interna. Una vez ocurrida la unión de todas las partes, la molécula completa de LPS es transportada a la superficie de la bacteria.

En el género *Bordetella* el estudio del LPS ha avanzado sólo en los últimos años, debido a que el principal esfuerzo de investigación sobre este género fue volcado hacia los factores de naturaleza proteica. Las características tanto estructurales como regulatorias de los factores de virulencia de naturaleza proteica como AC-Hly, PRN o FHA, no presentan grandes diferencias entre cada especie. Esto ha permitido extrapolar resultados obtenidos sobre alguna de las especies, en general *B. pertussis*, sobre el resto del género. Este ejercicio no ha sido posible de realizar en la síntesis y regulación del lipopolisacárido ya que existen diferencias estructurales según la especie analizada. En *B. pertussis* el LPS se encuentra compuesto por tres partes principales: la porción denominada lípido A, un trisacárido en la parte distal y el core uniendo las porciones anteriores (Fig. 1.5). A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas *B. pertussis* no presenta antígeno O, debido a que, como se describe más adelante, carece de los genes necesarios para su síntesis. *B. bronchiseptica*, por otro lado, presenta una estructura de LPS completa que contiene antígeno O (Fig. 1.5).

Otras diferencias se encuentran en cuanto al número de grupos acilo que sustituyen la parte glucocídica del lípido A. *B. bronchiseptica* es la única del género que posee seis sustituyentes al igual que otras bacterias Gram negativas como *E. coli*. El resto de las especies presenta sólo cinco (329). A su vez las longitudes de los mismos varían entre cada una de las especies. En cuanto a la estructura del core, ésta sólo ha sido descrita en su totalidad para una cepa de *B. pertussis* (55) y de manera parcial para *B. bronchiseptica* (54). La particularidad que presenta este core es la presencia de una única molécula de KDO, a diferencia de otros géneros en donde puede haber hasta tres moléculas en el core de su LPS (27, 287, 312). La enzima responsable del agregado de KDO al lípido A presenta un alto grado de homología en toda su secuencia con las enzimas presentes en bacterias de otros géneros que poseen más de una molécula de KDO en su LPS. El entorno en que esta enzima se desenvuelve parece regular el número de KDO ya que la enzima de *B. pertussis* cuando se encuentra en *E. coli* es capaz de agregar hasta tres moléculas (171).

Cuando se someten los LPS a corridas electroforéticas se puede observar la estructura compuesta por el lípido A y el core interno como una banda definida en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de las preparaciones de LPS denominada banda B. La otra banda presente (banda A), está compuesta por la estructura de la banda B sustituida por un trisacárido compuesto por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilmanosaminurónico (2,3-diNAcManA) y N-acetilglucosamina (GINAc) (56, 204). De esta manera queda completa la estructura del LPS presente en *B. pertussis*, en ocasiones denominado lipooligosacárido (LOS) dada su falta de antígeno O.

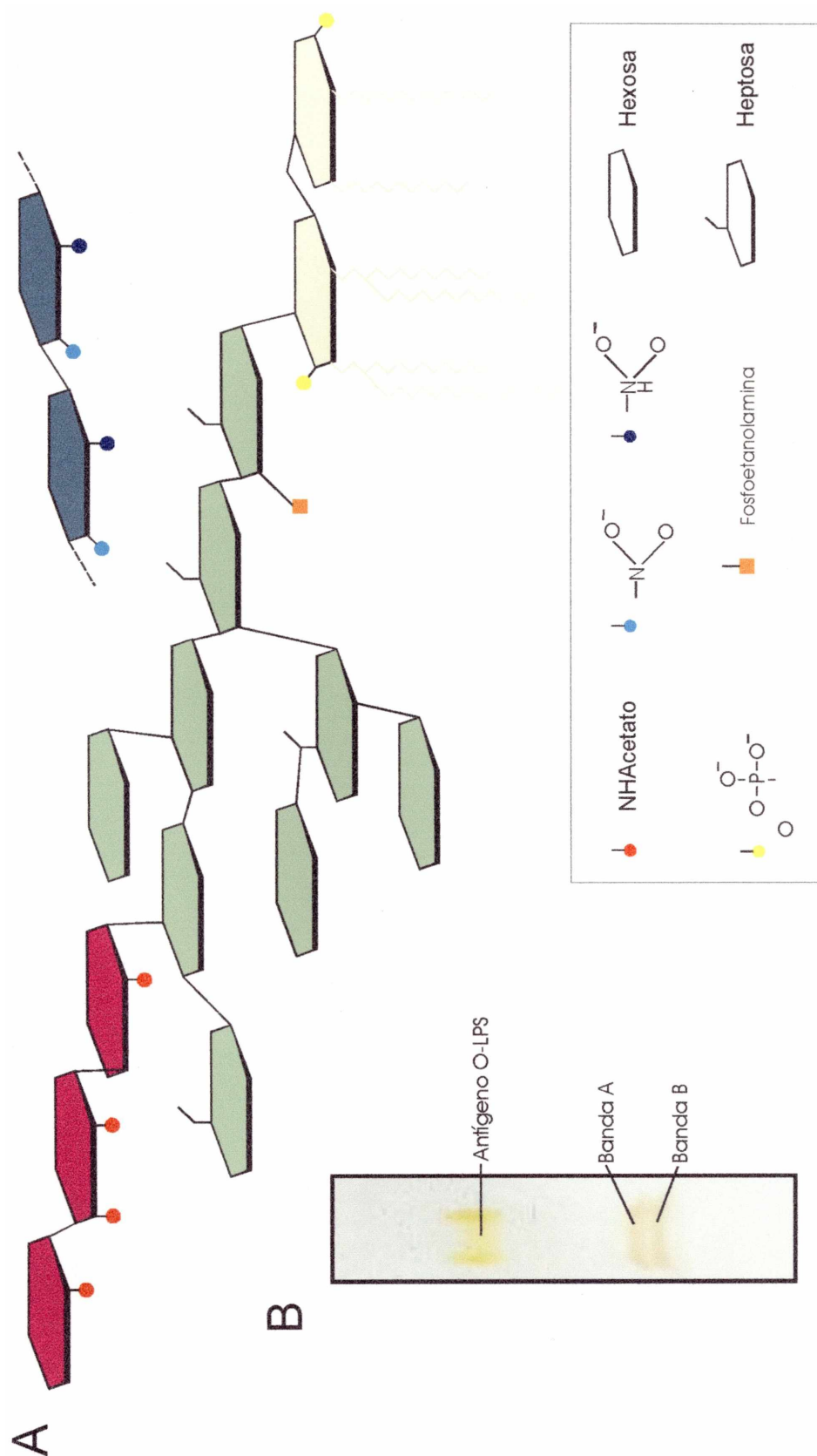


Fig. 1.5. Panel A. Representación esquemática de la estructura sugerida para el LPS de *B. bronchiseptica*. La molécula se encuentra compuesta por lípido A (morado), core (verde), trisacárido (rojo) y el homopolímero antígeno O (azul) cuyo sitio de unión al resto del LPS es aún desconocido. A fin de simplificar la representación se han ignorado los grupos OH y los oxígenos de los azúcares. Esta estructura es la que se deduce a partir del conocimiento del core de *B. pertussis* 1414 (Caroff et al 2000).

Panel B. Se presenta el perfil electroforético en SDS-PAGE del LPS de *B. bronchiseptica*. La banda B está compuesta por el lípido A y el core, la banda A por estas estructuras más el trisacárido. El LPS completo con una banda difusa de menor movilidad.

B. bronchiseptica. Se trata de un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilgalactosaminorúico (92).

En otras bacterias Gram negativas, los genes involucrados en la biosíntesis del LPS se encuentran generalmente agrupados según la porción que sintetizan pudiendo actuar con promotores comunes o no (312). En *Bordetella* esto se observa sólo en aquellos genes involucrados en la síntesis de las porciones glucosídicas más externas tales como el trisacárido y el antígeno O. Junto a estos genes, con un sentido de transcripción inversa al resto, se encuentran dos genes involucrados en la síntesis del core interno (*waaA* y *waaC*) separados entre si por tres pares de bases (Fig. I.6). Por otro lado alguno de los genes intervinientes en la síntesis del lípido A (*lpxA* y *pagP*) o del core interno (*waaF*) no se encontrarían formando un grupo de genes con funciones comunes. El resto de los genes necesarios para completar la síntesis del LPS aún no han sido descriptos. Sin embargo la reciente publicación del genoma de *B. bronchiseptica* muestra la existencia de marcos de lectura que presentan homología con genes conocidos en otras bacterias (271). Futuros estudios tendientes a determinar fehacientemente si estos genes se encuentran involucrados en la síntesis del LPS deberán ser realizados. A continuación en la Tabla I.4 se indican los genes descriptos hasta el momento.

Tabla I.4. Genes involucrados en la síntesis del LPS de *B. bronchiseptica*.

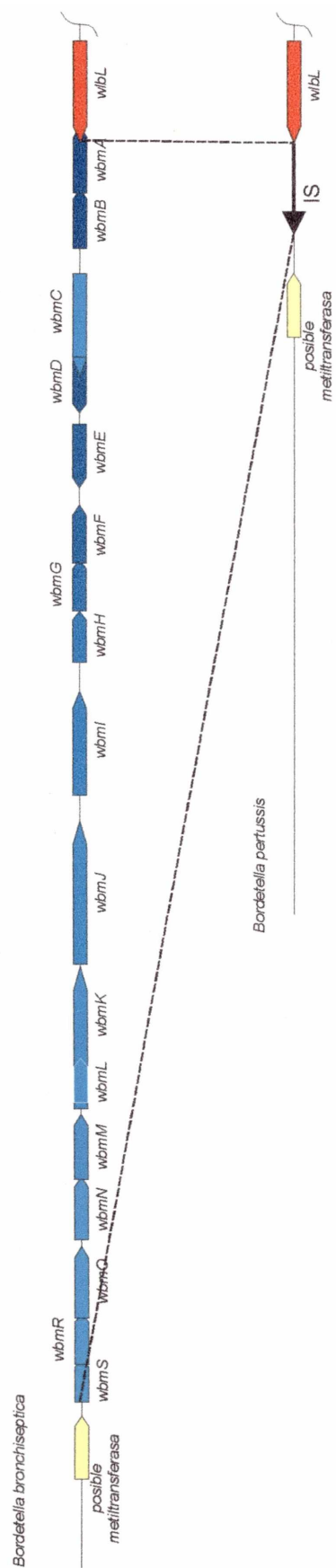
Nombre del gen	Función propuesta para el producto del gen	Referencia
Lípido A		
<i>LpxA</i>	UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa.	329
<i>PagP</i>	Palmitoil transferasa.	280
Core		
<i>WaaA</i>	Kdo transferasa.	4
<i>WaaC</i>	Heptosiltransferasa I.	4
<i>WaaF</i>	Heptosiltransferasa II.	4,5
Trisacárido		
<i>wlbD</i>	Epimerasa UDP-N-acetilglucosamina a UDP-N-acetilmanosamina.	4,5,281
<i>wlbL</i>	NDP-glicosil-4-6-dehidratasa (síntesis de FucNAcMe)	4,5,281
<i>wlbH</i>	Glicosiltransferasa (GINAc al final del trisacárido)	4,5,281
<i>wlbA-E</i>	Síntesis y transferencia al trisacárido de 2,3-diNAcManA	4,5,281
<i>wlbG</i>	Transferasa que inicia la síntesis sobre un lípido carrier	4,5,281
<i>wlbF</i>	Transferencia de grupos aminos (síntesis de 2,3diNAcGalA del Antígeno O)	4,5,281
Antígeno O		
<i>wbmA</i>	Glicosiltransferasa	4
<i>wbmB</i>	Desconocida	4
<i>wbmC</i>	Amidotransferasa	4
<i>wbmD</i>	Proteína transmembrana sin función asignada	4
<i>wbmE</i>	Proteína secretada sin función asignada	4
<i>wbmF</i>	Epimerasa/deshidratasa	4
<i>wbmG</i>	Epimerasa/deshidratasa	4
<i>wbmH</i>	Epimerasa/deshidratasa	4
<i>wbmI</i>	Amidotransferasa	4
<i>wbmJ</i>	Glicosiltransferasa	4
<i>wbmK</i>	Desconocida	4
<i>wbmL</i>	Exportador de Antígeno O (proteína de membrana)	4
<i>wbmM</i>	Exportador de Antígeno O (proteína de membrana)	4

<i>wbmN</i>	Exportador de Antígeno O (unión a ATP)	4
<i>wbmO</i>	Desconocida	4
<i>wbmP</i>	Desconocida	4
<i>wbmQ</i>	Formiltransferasa	4
<i>wbmR</i>	Formiltransferasa	4
<i>wbmS</i>	Desconocida	4
<i>wbmT</i>	Desconocida	4
<i>wbmU</i>	Formiltransferasa	4
Otros		
<i>Pgm</i>	Fosfoglucomutasa	355

Para *B. bronchiseptica* el locus *wbm* contiene 21 ORFs, de los cuales algunos presentan homología con genes involucrados en la síntesis del antígeno O de otras bacterias. A la luz de la estructura conocida actualmente del LPS de *B. bronchiseptica* es evidente que son necesarios algunos genes más (279). Por otro lado se han descrito siete ORFs cuya función es aún desconocida. Tres de ellos presentan homología con formiltransferasas, mientras que los cuatro restantes no presentan homología con ninguna de las proteínas presentes en las bases de datos. Esta región, al igual que el resto del locus *wbm*, no se encuentran presentes en *B. pertussis*. En su lugar se encuentra una secuencia de inserción (IS) (246, 279) lo que explica la ausencia de esta estructura en esta especie. La consecuencia evolutiva de este evento de rearrreglo genómico para la patogénesis y rango de hospedador de *B. pertussis* es aún desconocido.

El rol del LPS en la patogénesis de *Bordetella* y en la protección de la enfermedad comenzó a hacerse evidente sólo a partir de fines de la década del 90 la disponibilidad de información acerca de los genes que participan de la síntesis de las estructuras distales del LPS (4) lo que permitió la construcción de mutantes con estructuras truncas de LPS. Dado que los genes conocidos eran relacionados con las estructuras distales del LPS, son éstas las zonas más estudiadas. Este enfoque ha sido en detrimento de otras regiones como la lipídica o el core salvo algunas pocas excepciones (5, 171, 280, 355). West y colaboradores (2000) fueron los primeros en utilizar en ensayos *in vivo* un mutante de *B. bronchiseptica* con una estructura de LPS alterada (355). La mutación se realizó sobre el gen que codifica para la fosfoglucomutasa, *pgp* que impide la síntesis de la banda A y del antígeno O de esta bacteria. Se pudo observar que la ausencia de estas estructuras en el modelo de infección en ratones impide la colonización efectiva de los pulmones, siendo eliminada la bacteria nueve días después del momento de la inoculación. El gen *pgp* sin embargo podría estar involucrado en otros procesos independientes de la síntesis del LPS por lo que la asignación de un rol para esta molécula no fue claro. Harvill y colaboradores realizaron construcciones a partir de la interrupción de genes del locus *wlb* (146). El mutante cuyo locus *wlb* se encontraba delecionado presentaba un LPS compuesto sólo por la banda B. Si bien este mutante pudo colonizar y persistir por al menos 50 días en la cavidad nasal del hospedador, éste fue erradicado de la tráquea y de los pulmones del animal a los 15 días postinoculación. Este mutante presentó un aumento en la sensibilidad a la acción bactericida del suero nativo. Sin embargo, la infección de la cepa parental en un animal deficiente en la síntesis del factor C5 del complemento no presentó diferencias respecto a la que se produce en

Genes involucrados en la biosíntesis del antígeno O



Genes involucrados en la biosíntesis del trisacárido-core

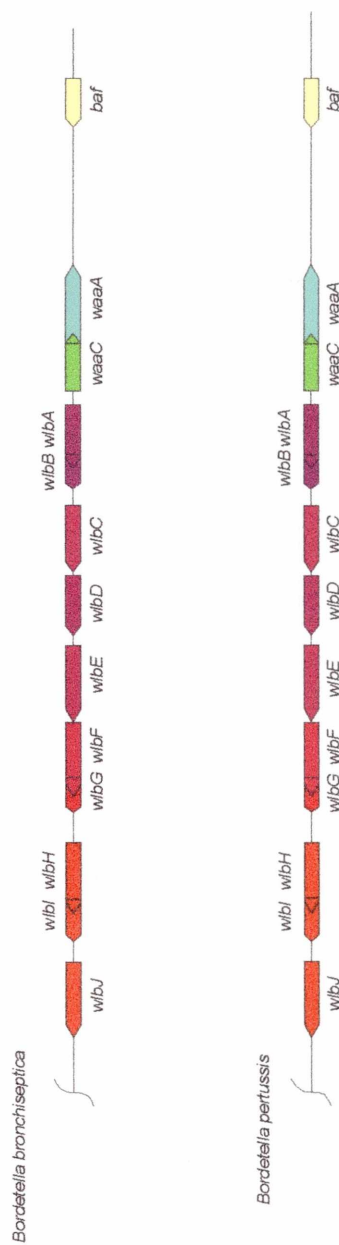


Fig. 1.6. Esquema de la distribución genética de los genes conocidos hasta el momento involucrados en la síntesis del LPS de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. Se indica con líneas el reemplazo del locus *wbm* presente en *B. bronchiseptica* por la secuencia de inserción en *B. pertussis*.

un animal con su sistema de complemento normal. El aumento de sensibilidad presente en el mutante no sería la razón, entonces, de su eliminación del hospedador.

Para la determinación del rol del antígeno O durante la infección de *B. bronchiseptica* se construyeron mutantes con una delección en el locus *wbm*. Si bien los mismos no contienen antígeno O la infección transcurre de manera indistinguible al de la cepa parental con un LPS completo (53). Por otro lado, la presencia del antígeno O es necesaria para la resistencia a la acción bactericida del suero, confirmando los resultados obtenidos anteriormente. El mecanismo por el cual esta resistencia ocurre parecería ser a través de la prevención de la activación de la cascada del complemento (53). En conclusión, la ausencia del trisacárido y/o del antígeno O no perjudican el proceso de adhesión y colonización de manera significativa, ya que las bacterias mutantes son capaces de colonizar al animal e incluso en algunos casos multiplicarse dentro del mismo. Sin embargo la presencia de estas estructuras son necesarias para que la bacteria pueda resistir la acción bactericida presente en las primeras etapas de la infección ya que si están ausentes las bacterias no sobreviven más allá del día 15 en los pulmones del hospedador.

Las estructuras distales del LPS no sería las únicas necesarias para que la bacteria pueda colonizar el tracto respiratorio del hospedador. La interrupción del gen *pagP*, involucrado en la sustitución de un residuo de ácido palmítico al lípido A del LPS es un ejemplo de ello (280). La bacteria con este gen interrumpido ($\Delta pagP$) presenta diferencias significativas respecto a la cepa parental en cuanto al grado de colonización observado tanto en la tráquea como en los pulmones del animal. Mientras que la cepa salvaje es capaz de persistir en ambos órganos más allá de los 40 días transcurridos del momento de la inoculación, el mutante $\Delta pagP$ no puede ser aislada luego de los 15 días postinoculación (280).

A través de los estudios descriptos es evidente que no es posible asignarle un único rol al LPS para el proceso de infección. El papel de esta macromolécula sería diverso y en ocasiones podría tratarse de un cofactor necesario para la secreción de otros factores de virulencia.

Sistema de secreción tipo III. Se han descripto hasta el momento seis mecanismos diferentes a través de los cuales las bacterias son capaces de transferir factores de virulencia proteicos hacia el interior de la célula eucariota. Estos incluyen la vía independiente de secuencia señal (Tipo I), la vía dependiente de la secuencia terminal (Tipo II), la vía dependiente de contacto (Tipo III), el sistema de conjugación o sistema de secreción Tipo IV, la vía de secreción mediante dos integrantes y la vía de autotransporte (32, 52, 66, 67, 72, 151, 173, 174, 302, 303, 304). Dentro del grupo *Bordetella* se han descripto los dos últimos sistemas para FHA y PRN respectivamente mientras que la toxina pertussis utiliza el sistema Tipo IV, también utilizado por algunas bacterias para transferir moléculas de ADN (65). El sistema tipo III ha sido descripto en *Bordetella* recientemente (366). Este sistema se encuentra presente en varias bacterias Gram negativas incluyendo *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* y EPEC (62, 72, 166, 361). Este sistema permite a la bacteria transferir

proteínas directamente al citosol de la célula a través de un sistema similar a una aguja de inyección. El proceso se induce por el contacto de la bacteria con la superficie de la célula blanco a través de mecanismos aún no del todo caracterizados (196). Las proteínas efectoras una vez en el citosol de la célula alteran su fisiología normal (205) dando como resultado cambios que le permiten a la bacteria por ejemplo evadir la respuesta inmune. Los genes que codifican para el aparato secretor son varios y se encuentran conservados en los diferentes géneros, mientras que las proteínas que son secretadas a través del aparato presentan una gran diversidad sin presentar secuencias conservadas ni residuos similares (73). Se suman a éstas una serie de proteínas accesorias (Syc en *Yersinia*) que estarían involucradas en el proceso de traslocación a través de la luz de la "aguja" (72).

Las proteínas efectoras del sistema III de *B. bronchiseptica* no han sido caracterizadas en su totalidad, sin embargo es posible atribuirle al sistema algunas funciones. Este sistema induce citotoxicidad en varias líneas celulares (342, 367), desfosforilación de proteínas de la célula hospedadora, (367) y activación de MAP quinasas, ERK1 y ERK2 (366). A su vez durante las infecciones con *B. bronchiseptica* en células epiteliales de rata (L2) es posible observar una agregación citoplasmática aberrante del factor de transcripción NF- κ B (366). Este factor no es traslocado durante la infección con esta bacteria aún ante un estímulo como la presencia de TNF- α . Esta agregación con la consecuente inhibición de la entrada de NF- κ B al núcleo sería responsabilidad de efectores del sistema III de esta bacteria.

En ensayos *in vivo* se ha observado que el sistema tipo III contribuye a la colonización de la tráquea tanto en modelos murinos como en ratas (366, 367). Las células inflamatorias que ingresan al pulmón durante la infección desarrollan un proceso apoptótico si la cepa utilizada posee el sistema tipo III activo. El número de células apoptóticas decrece significativamente si la cepa utilizada es un mutante defectivo en la expresión de BscN uno de los componentes del sistema secretor. En este último caso la respuesta humoral contra los principales antígenos de *B. bronchiseptica* es más elevada que durante una infección normal (366, 367). Sin embargo se han descrito resultados que en principio parecen contradictorios al observado en el modelo animal. Se ha observado *in vitro* que este sistema produce la muerte de diferentes células ya sea derivadas de macrófagos o epiteliales, de manera independiente de la presencia de caspasa-1 (326). A su vez no se ha observado la activación de caspasas intermedias y la morfología de la célula afectada obedece a un patrón de muerte necrótica. A pesar de que el mecanismo por el cual se logra la muerte de las células del hospedador debe ser aún determinado de manera fehaciente, es claro que el sistema de tipo III se encontraría involucrado en la modulación de la respuesta inmune y podría contribuir en el desarrollo de etapas más avanzadas de la infección.

Regulación de la expresión de los factores de virulencia.

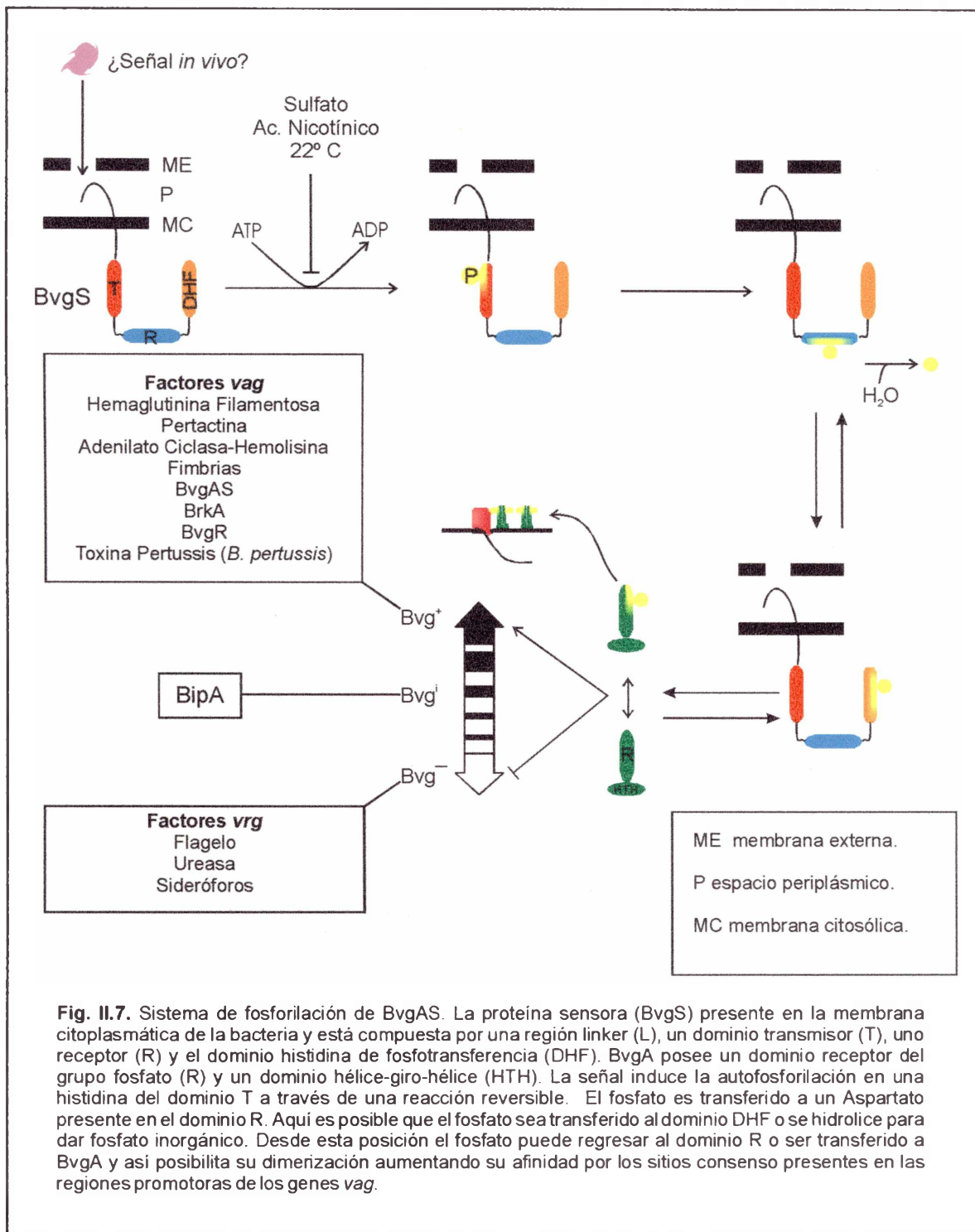
La síntesis de la mayoría de los factores de virulencia de *Bordetella* descritos anteriormente, a excepción de la citotoxina traqueal, que es un producto de la síntesis del peptidoglicano, se encuentra bajo el control de un locus denominado *Bordetella virulent*

gene (*bvg*, antes designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia). Este locus *bvg* fue identificado por Weiss y colaboradores (354) cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, abolía simultáneamente la síntesis de PT, FHA, AC-Hly y TDN (denominados factores *bvg*-activados). Posteriormente se demostró que la pertactina también es una proteína *bvg*-regulada (61). Se pudo observar además que las bacterias conteniendo mutaciones en el locus *bvg* que eliminan la expresión coordinada de los genes *bvg*-activados poseen menor capacidad para causar la enfermedad y por ello son designadas bacterias avirulentas. Estas mutaciones pueden complementarse mediante la introducción de la región *bvg* salvaje en un plásmido capaz de replicarse en *Bordetella*, demostrándose de esta manera que los genes *bvg* actúan en *trans* (195).

Se ha descrito que mutaciones que ocurren espontáneamente a nivel del locus *bvg* pueden llevar a un fenómeno irreversible denominado cambio de fase (208, 198). Este término se refiere a la aparición de variantes avirulentas genéticamente estables a través de los subcultivos, que no expresan los factores *bvg*-activados. Hasta el momento se han podido caracterizar dos tipos de mutaciones espontáneas que llevan a dichas variantes de fase: una es un corrimiento del marco de lectura dentro de una cadena de citosinas y la otra corresponde a pequeñas deleciones internas del locus *vir*, (323). El significado de estas mutaciones en relación con la biología y la evolución de *B. pertussis* y de las otras especies de *Bordetella* aún no se ha esclarecido.

Otro fenómeno mediado por el locus *bvg* es la *modulación fenotípica* que consiste en la alternancia reversible entre dos fases fenotípicas diferentes denominadas Bvg⁺ o virulenta y Bvg⁻ o avirulenta (70). Este fenómeno ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno denominadas agentes moduladores tales como temperatura, presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico en el medio de cultivo, que son sensadas por los productos BvgAS que codifica *bvg* (14, 15, 78, 321, 338, 339). Estas proteínas BvgAS forman parte de la familia de sistemas de transducción de señales de dos componentes y se expresan en ausencia de dichas señales. Estas proteínas no sólo regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para factores de virulencia mencionados (denominados *vag* por *virulence-activated genes*) sino que además regulan negativamente la síntesis de algunas proteínas de membrana externa (genes denominados *vrg* por *virulence-repressed genes*) (15), citocromos y en forma particular a la flagelina y sideróforo en *B. bronchiseptica* (75, 99, 272). Así, la fase Bvg⁺ o virulenta presente cuando BvgAS está activo, se caracteriza por la expresión de los genes que codifican para la mayoría de los factores asociados a la patogénesis del microorganismo, mientras que la fase Bvg⁻ o avirulenta presente cuando BvgAS está inactivo se caracteriza por la ausencia de los productos codificados por los genes *vag* y por la expresión de los genes *vrg* (Fig. I.7).

Recientemente se ha demostrado que BvgS puede sensor señales redox del medio ambiente (35). Esto provee una visión interesante respecto al origen evolutivo de este sistema en *Bordetella*. La regulación por parte de un mismo sistema de genes metabólicos (citocromo d y c oxidasas) y genes de virulencia/avirulencia sugieren que el



sistema BvgAS fue utilizado por el ancestro de la bacteria que hoy es patógena (75,99). Los genes cuyos productos están involucrados en el ciclo infeccioso de la bacteria podrían haber sido adquiridos posteriormente y ser sometidos a la regulación de BvgAS previamente presente, probablemente debido los requerimientos simultáneos de la expresión de ciertos factores bacterianos y de los citocromo d y c oxidasa.

El sistema de transducción de señales de dos componentes no es propio de *Bordetella* ya que los mismos han sido descritos para un gran número de bacterias e incluso para algunos eucariotas. Estos sistemas responden a diferentes condiciones ambientales y no

necesariamente están involucrados en procesos de patogénesis (58, 64, 75, 268, 272) (Tabla I.6).

Tabla I.6. Sistemas de dos componentes descriptos para diferentes bacterias.

Microorganismo	Sistema de dos componentes	Señal que sensa	Respuesta o genes regulados
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirA/VirG	Compuestos fenólicos. Monosacáridos.	Virulencia.
<i>Bacillus anthracis</i>	pXO1	CO ₂ .	<i>Pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> . Capsula.
<i>Brucella</i>	BvrR/BvrS	Desconocido	Homeostasis de la membrana externa
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	DtxR	Hierro.	Toxina diftérica.
<i>Escherichia coli</i>	EnvZ/AmpR	Osmolaridad.	OMPs.
	PhoR/PhoB	Fosfato.	Regulación del metabolismo de fósforo.
	CheA/CheBy	Quimioattractantes.	Quimiotaxis.
	EvgA/EvgS	Temperatura, SO ₄ -2, ácido nicotínico.	Desconocido.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NtrB/NtrC	Ausencia de nitrógeno.	Fijación de nitrógeno.
<i>Mycobacterium</i>	PhoP	Desconocido	Virulencia
	MprA	Desconocido	Virulencia
	devR	Desconocido	Virulencia
<i>Proteus mirabilis</i>	UrcR	Urea.	Ureasa.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RegA/RegB	Hierro.	Exotoxina A.
	CzcR/CzcS	Metales pesados. Carbapenem	Genes relacionados con la resistencia a metales pesados y antibióticos
<i>Salmonella spp</i>	SirA/HilA	Desconocido	Sistema secreción tipo III.
	PhoP/PhoQ	Calcio y Magnesio.	Genes de virulencia
<i>Shigella flexneri</i>	VirRF/virB	Temperatura.	<i>Inv</i> , <i>ipa</i> .
<i>Vibrio cholerae</i>	ToxS/ToxR TcpP/TcpH	Osmolaridad, temperatura y pH. Es dependiente de la cepa analizada.	Toxina colérica.
	IrgB	Hierro.	OMPs.
<i>Yersinia spp</i>	VirF	Temperatura.	<i>Vir</i> , <i>yop</i> .

El sistema BvgAS de *Bordetella* en un principio se lo consideró como un sistema on/off o de encendido/apagado de los genes de virulencia (110, 236). Sin embargo, la descripción reciente de proteínas de expresión intermedia que no corresponden ni a los genes *vag* y ni a los *vrg* (37, 78), ha replanteado a BvgAS como un sistema tipo reostato entre dos fases extremas, una la de virulencia y la otra de avirulencia. Entre ambos extremos existiría una graduación de fases (Fig. I.7).

Los genes *bvgA* y *bvgS* se encuentran formando un operón (13) y su transcripción depende de cuatro promotores P1, P2, P3 y P4. Los promotores P1, P2 y P4 son regulados por BvgA. De estos tres, el promotor P4 produce un ARNm antisentido complementario a los transcritos expresados por el resto de los promotores. La función de este ARNm es aún desconocida, pero podría estar involucrado en la estabilización de los transcritos impidiendo la formación de estructuras secundarias (308). El promotor P2 es constitutivo y responsable de la expresión basal de BvgS y BvgA (298, 308).

El componente sensor de este sistema de transducción de señales, BvgS (135 KDa) al igual que otros sensores de otros sistemas presenta dominios periplasmáticos y transmembrana (13,324). Sin embargo a diferencia de otras proteínas de la familia, también posee un dominio linker y otras regiones usualmente relacionadas con reguladores de respuesta como BvgA (13, 324). La porción N-terminal de BvgS que se encuentra en el espacio periplásmico (324) junto a la región linker consecutiva, son las responsables de sensar y transmitir respectivamente la señal externa hacia la parte C-terminal presente en el citoplasma de la bacteria (225, 227). La delección de esta última porción hace que BvgS no sea funcional (13, 26, 337). En el espacio citoplasmático BvgS se encuentra dividida en tres dominios diferentes, transmisor, receptor y el extremo C-terminal responsable de la transferencia final de un grupo fosfato a BvgA. La traducción de la señal se inicia en presencia de condiciones ambientales particulares con una fosforilación autocatalizada de BvgS dependiente de ATP en una histidina (H₇₂₉) presente en el dominio transmisor. La transferencia del grupo fosfato hacia el dominio C-terminal es dependiente de la presencia del dominio receptor (338). Este último dominio no sólo regula de manera positiva esta transferencia, si no que puede revertir la transferencia refosforilándose a sí mismo retardando la activación de BvgA (Fig. I.7). Finalmente, el dominio C-terminal de BvgS traduce la señal fosforilando a BvgA que es una proteína citoplasmática de 23 KDa (339). Esta forma fosforilada de BvgA, BvgA~P, es la que posee mayor afinidad por los sitios de unión presentes en los promotores de los factores de virulencia regulados por este sistema (42, 44, 179, 321).

El activador transcripcional BvgA está formado por dos dominios diferentes: un dominio receptor en la porción N-terminal y un dominio hélice-turn-hélice (HTH), característico de otras proteínas reguladoras en el extremo C-terminal (13, 324). La porción HTH es la responsable de la unión específica a las secuencias de ADN de los promotores de aquellos genes que serán activados por BvgA (42, 297). Como sitio de unión de BvgA se ha descrito una secuencia TTTCCTA de siete bases y secuencias homólogas que se encuentran de manera directa o invertidas en los genes regulados por BvgA (297, 179). La unión de BvgA~P a estas secuencias induciría la oligomerización de BvgA (308). El dímero de BvgA~P presenta una mayor afinidad por la secuencia consenso de siete bases (42). Esta secuencia se encuentra en general alejada del inicio de transcripción, sin embargo una vez que se une un dímero de BvgA~P a la secuencia consenso se unen luego sucesivos dímeros hasta alcanzar el sitio de unión de la ARN polimerasa. Esta enzima a su vez interacciona con la molécula de BvgA~P adyacente al inicio de transcripción de manera de que este proceso se inicie con mayor eficiencia (43).

Los genes regulados por BvgA pueden ser agrupados en cuatro clases según la cinética de expresión (Fig. I.8). Los primeros promotores que se expresan son los de la clase 2 presentes por ejemplo en la adhesina FHA. Este promotor contiene un sitio de alta afinidad para BvgA. Si bien BvgA puede unirse a este sitio, sólo la forma fosforilada es capaz de activar el inicio de la transcripción (44). El primer dímero de BvgA~P se une de manera específica a la secuencia consenso, mientras los dos siguientes en el caso del gen *fhaB*, lo harían de manera cooperativa independientemente de la secuencia. Luego

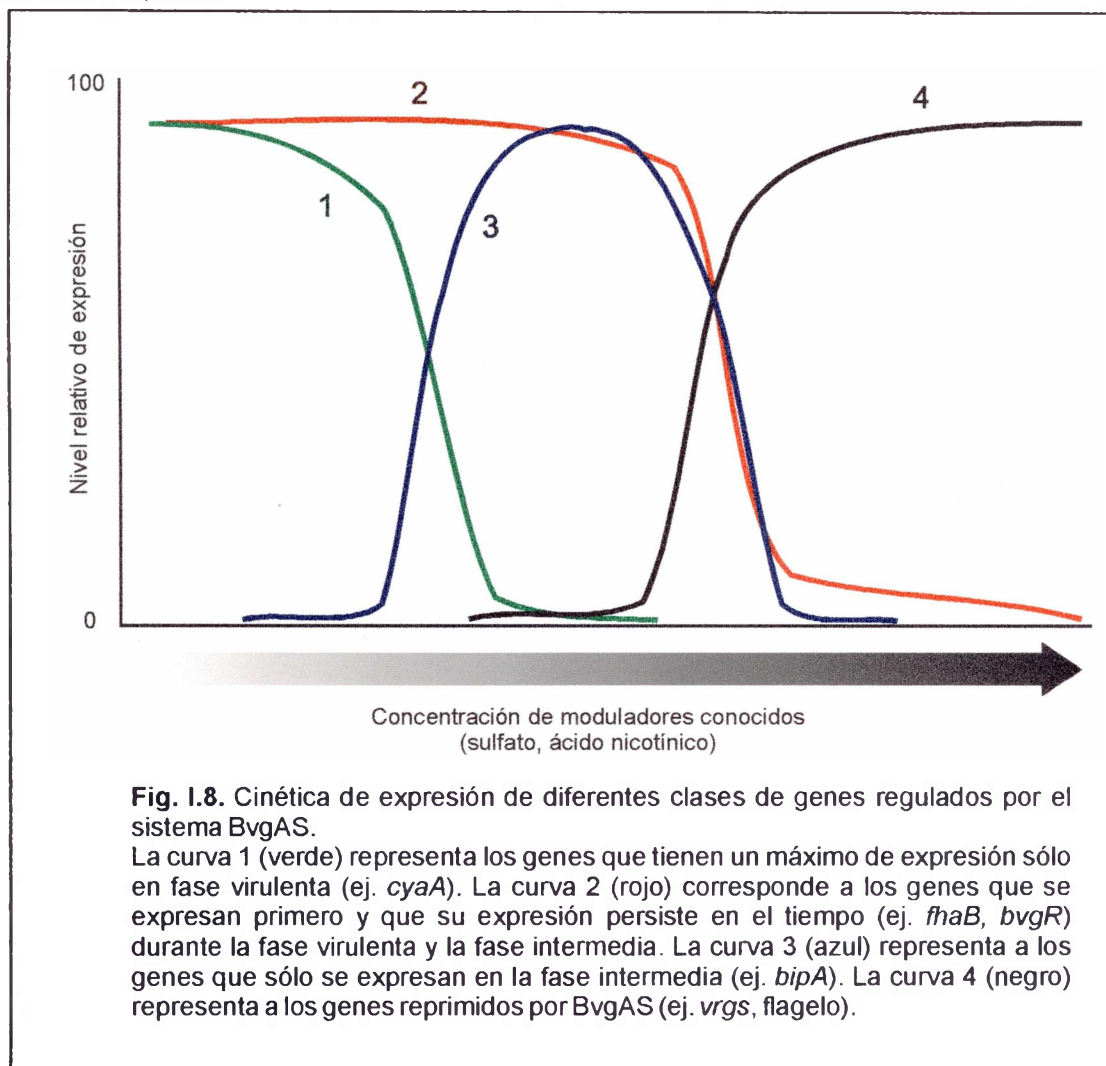
los dominios C-terminales de la subunidad α de la ARN polimerasa se unen a los dímeros de BvgA~P desde el otro lado de la cadena de doble hélice del ADN iniciándose así la transcripción del gen (41).

Los genes de la clase 1 como *cyaA* y *ptxA*, no poseen sitios de unión para BvgA de alta afinidad y en su lugar se encuentran múltiples secuencias con leves diferencias respecto a las de alta afinidad espaciadas a lo largo de la secuencia upstream de cada uno de los genes (129, 179, 374). BvgA debe estar fosforilado para unirse a estos sitios y la concentración de los dímeros es mucho mayor a la requerida para que se active *fhaB* y por ello se transcriben más tardíamente (42, 129, 179, 374).

Los genes de clase 3 presentan un patrón de expresión más complejo. En el caso de un gen que codifica para una proteína característica de la fase intermedia BipA (*bipA*), se han descrito secuencias consenso de unión para BvgA de alta y baja afinidad (90). El primero se encuentra upstream del gen y actuaría de igual manera que en el caso de *fhaB*. Sin embargo los sitios de baja afinidad se encuentran ubicados downstream del inicio del gen *bipA*. La unión de BvgA~P a estos sitios impediría la transcripción del gen, probablemente impidiendo de manera estérica la unión de la ARN polimerasa al sitio de inicio de la transcripción. A través de la detección de manera cuantitativa de los moduladores de BvgAS es posible regular la relación de concentraciones entre BvgA y BvgA~P. El delicado balance entre estas dos formas de BvgA permiten o no la expresión de los genes de la fase intermedia. Mientras que la concentración de BvgA~P es alta tanto los sitios de alta como de baja afinidad se encuentran ocupados por lo que estos genes no se expresarán. Al descender el nivel de la forma activa de BvgA los sitios de baja afinidad son liberados y el gen de fase intermedia es expresado. Finalmente, una vez que la cantidad de BvgA~P haya descendido notablemente los sitios de alta afinidad serán liberados y el gen deja de ser expresado (Fig. I.9).

La información disponible acerca de los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes clase 4 que corresponde a proteínas propias de la fase avirulenta (genes *vrg*) es aún escasa. Sólo en el caso de *B. pertussis* se ha descrito que el mecanismo de inactivación de estos genes es de manera indirecta a través de la participación de una proteína reguladora denominada BvgR (242). El gen que codifica para este regulador (gen *bvgR*) se encuentra río abajo del locus *bvgAS* (242). Este gen ha sido descrito recientemente en *B. pertussis* y su producto de transcripción BvgR contiene motivos de reconocimiento de secuencias consenso presentes en los promotores de los genes *vrg* (25). A su vez este gen es regulado negativamente por BvgA (240). Es decir que su regulación es diferente al observado en el resto de genes *vag* (241). Mientras que para los genes *vag*, la unión de BvgA~P ocurre de manera secuencial desde un punto apartado del sitio de unión de la ARN polimerasa hacia dicho sitio, en el caso del gen *bvgR*, la unión ocurre primero cerca de este sitio y luego en los más alejados. Para visualizar más sencillamente como trabajaría toda esta maquinaria en la figura I.7 se muestra un esquema indicando las relaciones entre el locus *bvgAS*, el gen *bvgR* y los genes *vag* y *vrg*. La delección del gen *bvgR* en *B. pertussis* perjudica significativamente la efectividad de infección en un desafío en donde el inóculo se administra en forma de aerosol (243).

reciente publicación del genoma completo de *B. bronchiseptica* ha permitido determinar la presencia de este gen en esta especie. Sin embargo, no han sido publicados aún resultados acerca de la posible función de este gen represor en la patogénesis de *B. bronchiseptica*.



En la actualidad sólo se conocen algunas señales que actúan *in vitro* a través de BvgAS pero aún no se podido determinar si este sistema funciona *in vivo* y menos aún cuáles serían las señales que estarían siendo sensadas. Experimentos empleando mutantes que expresan constitutivamente las proteínas del sistema BvgAS o por el contrario que sean defectivos en la expresión del mismo muestran que la fase virulenta (Bvg⁺) es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección (77) mientras que la fase Bvg⁻ o avirulenta sería incapaz de iniciar la infección (77, 115, 228, 240). En el caso de *B. bronchiseptica* la fase avirulenta parece ser la más apta para el desarrollo de la bacteria en condiciones limitantes de cultivo. Estos datos sugieren que la función de BvgAS es sensor si la bacteria se encuentra dentro o fuera del tracto respiratorio del mamífero y así actuar en consecuencia. Dado que *B. bronchiseptica* y no *B. pertussis* ha sido encontrada fuera del hospedador se ha sugerido que la fase Bvg⁻ en *B. pertussis* es un remanente evolutivo sin una función actual (76). Sin embargo, el hecho que no ocurra la evolución hacia una expresión constitutiva a través de una simple sustitución de una

base en BvgS como es el cambio de Histidina por Arginina en la posición 570 hace pensar que este sistema de dos componentes tenga una función *in vivo* (247).

La fase intermedia en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* parecen ser similares y estarían involucradas en la transmisión en forma de aerosol de las bacterias entre los hospedadores (327). Scarlato y colaboradores han sugerido que cuando *Bordetella* se encuentra con un nuevo hospedador, las adhesinas deben ser expresadas en primer lugar para mediar la adhesión a los tejidos epiteliales, mientras que las toxinas no son expresadas hasta unas horas después (307). Durante estas primeras horas la bacteria puede avanzar hacia un fenotipo Bvg⁺ completo o volver al fenotipo Bvg⁻ si es eliminado nuevamente al ambiente. El cambio de promotores entre los factores de virulencia de manera de alterar la cinética de expresión de adhesinas y toxinas impiden la correcta infección de *B. bronchiseptica* en el modelo murino (191).

El sistema BvgAS no es el único sistema de dos componentes descrito para *Bordetella*. La descripción del sistema Ris en *B. bronchiseptica* ha ampliado el conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de los factores de virulencia de este género. Al igual que BvgAS, el sistema Ris (del inglés *regulator of intracellular response*) está compuesto por un regulador (RisA) y un sensor (RisB) (177). Ambos genes del locus se encuentran separados entre sí por una única base en *B. bronchiseptica* y en *B. pertussis*. El sistema se encuentra involucrado esencialmente en la resistencia al estrés oxidativo y regular la expresión de una fosfatasa ácida. Esta proteína es la única que se conoce es regulada por Ris. La expresión de esta enzima es inducida durante la vida intracelular probablemente para poder resistir la acción oxidativa del contenido lisosomal. La relevancia de este sistema en el proceso global de infección queda aún por ser determinado de manera definitiva.

La comprensión de los mecanismos que gobiernan la expresión de los diferentes factores de virulencia ha avanzado en mayor grado al conocimiento obtenido sobre cuando y por qué esta regulación ocurre. La hipótesis con más consenso es la que considera a la fase avirulenta de *Bordetella* como la adecuada para la supervivencia fuera del hospedador. La ausencia de un nicho fuera de éste para *B. pertussis* entre otras observaciones indican que el modelo propuesto presenta aristas no del todo resueltas. La comprensión de la función del sistema BvgAS durante una infección *in vivo* permitirá sin duda avanzar en este aspecto, permitiendo finalmente comprender el ciclo infeccioso de las bacterias del género.

Variación de la expresión de diferentes factores bacterianos *in vivo*

Un aspecto importante de destacar es que algunas especies del género *Bordetella* como *B. bronchiseptica* pueden persistir en el hospedador por largos períodos contribuyendo a la existencia de portadores asintomáticos y a estadíos crónicos de la infección. En pacientes en los cuales se ha podido determinar el fenómeno de persistencia se ha observado que las bacterias que se aislaron en los estadíos tempranos de la enfermedad expresaban las adhesinas y toxinas necesarias para iniciar la infección,

pero no así las bacterias que se aislaron luego de cierto tiempo que los síntomas de la enfermedad han desaparecido (135). Asimismo, se han observado variaciones en la estructura del lipopolisacárido (LPS) (336), uno de los principales componentes de la superficie bacteriana. Para infecciones persistentes causadas por *B. bronchiseptica*, el LPS de los aislamientos obtenidos a medida que avanza la infección hacia la fase crónica de la enfermedad contiene menor cantidad de residuos glucosídicos cada vez. Así, la bacteria que comienza la infección presenta un LPS con su estructura completa es decir, compuesta por las bandas A y B junto al antígeno O. Sin embargo, durante la fase aguda se puede observar que las bacterias aisladas en esta etapa disminuyen drásticamente la cantidad de antígeno O del LPS y finalmente en los aislamientos obtenidos durante la fase crónica se puede observar un fenotipo conocido como *deep rough* o rugoso profundo el cual presenta una única banda de mayor movilidad. La pérdida progresiva de residuos glucosídicos observada durante la infección podría ser reflejo de una adaptación al hospedador, que lleva finalmente a poseer un LPS similar al presente a *B. pertussis*. Estas modificaciones presentes durante un proceso crónico de infección podrían obedecer a un proceso adaptativo en respuesta a la defensa montada por el hospedador por la presencia del patógeno.

Aunque las bases genético moleculares de los cambios en el LPS no han sido analizadas, en *Bordetella spp* es bien conocida la variación *in vitro* de los factores de virulencia de acuerdo con las condiciones del entorno. Como hemos descripto más arriba a través del funcionamiento del sistema de dos componentes BvgAS ciertas señales externas como la baja temperatura, la presencia de iones sulfato o de ácido nicotínico inhiben la expresión de las adhesinas y toxinas y a la vez activan la síntesis de otras moléculas (variante avirulenta) (15, 14, 70, 78, 306, 338, 339). La ausencia de dichos agentes activa la síntesis de los factores de virulencia (variante virulenta). Si bien la identidad de los moduladores de la expresión *in vivo* aún se desconoce, se cree que la regulación ejercida por el locus *bvg* tendría un rol importante en el curso de la infección, en particular en la persistencia de la bacteria en el hospedador.

Objetivos de este trabajo de Tesis

En este trabajo de Tesis nos hemos propuesto investigar el efecto de alteraciones estructurales en el LPS sobre la integridad de la membrana externa, la síntesis y secreción de otros componentes bacterianos y en particular sobre la patogenicidad y persistencia de la bacteria en el hospedador. El estudio de esta molécula resultó ser un verdadero desafío ya que es una de las moléculas menos caracterizadas dentro del género *Bordetella*. Esto se debe quizás a que durante muchos años las investigaciones sobre *Bordetella* estuvieron focalizadas fundamentalmente sobre los factores de virulencia de naturaleza proteica. Así, las propiedades del LPS en el entorno natural de la bacteria y su interacción con otros componentes bacterianos constituyen aspectos muy poco explorados. En relación a este último punto existen numerosos estudios que sugieren una conexión entre toxinas de la familia RTX (*repetición en toxina*) (71) y el LPS. Se ha

reportado que mutaciones específicas que modifican el ensamblaje del core interno del LPS (cluster *rfa*, 17, 48, 312) afectan la secreción y la biosíntesis de la toxina RTX-Hemolisina (Hly) de *Escherichia coli* (24, 85, 206). *Bordetella* spp sintetiza una toxina RTX, la AC-Hly (136, 154). En estudios de la secreción hemos determinado que la secreción de esta toxina en medios de cultivo suplementados con un agente derivado de las ciclodextrinas se ve incrementada (165) correlativamente con un incremento en la liberación de LPS al medio extracelular (164, 165). Se ha podido determinar además la presencia de vesículas de membrana externa en sobrenadantes de cultivo, las cuales contienen LPS y AC-Hly (163).

En este marco no sólo abordaremos el rol del LPS y el de su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia en el hospedador en si mismo sino también su posible relación con la expresión de otros factores de virulencia y en particular se analizará si el fenómeno observado para la hemolisina de *E.coli* puede ser extendido a la AC-Hly de *Bordetella* spp.

Para esclarecer estos aspectos hemos dirigido nuestras investigaciones hacia la construcción y caracterización tanto *in vitro* como *in vivo* de mutantes en *B. bronchiseptica* que presentan un fenotipo de LPS alterado, en particular un fenotipo "*deep rough*". La elección de este tipo de alteración se basó por un lado, en la necesidad de obtener un mutante con una modificación profunda en la estructura del LPS que posibilite la adjudicación de algún rol de esta molécula en el curso de la infección; y por otro lado, en que diferentes aislamientos de pacientes con infección crónica de *B. bronchiseptica* presentaron un fenotipo de LPS del tipo *deep rough* o rugoso profundo (134)

A continuación se detalla cada uno de los aspectos desarrollados durante este trabajo de tesis

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

A. Análisis de la variación estructural del LPS frente a señales *in vitro* sensadas por el sistema de transducción de dos componentes BvgAS.

Se ensayaron cultivos de *B. bronchiseptica* en presencia de señales conocidas que afectan la expresión de diferentes componentes bacterianos de forma de corroborar si los cambios observados en la estructura del LPS a lo largo de la infección responde a una regulación coordinada mediada por el sistema de dos componentes BvgAS.

B. Obtención de mutantes de *Bordetella bronchiseptica* que presenten un lipopolisacárido con una estructura alterada y similar al que presentan los aislamientos obtenidos de pacientes con infección crónica.

Se construyeron mutantes que presenten un fenotipo de LPS similar al observado en los aislamientos de pacientes con infección crónica por mutagénesis al azar empleando al transposon Tn5 o por mutagénesis sitio específica.

C. Caracterización fenotípica de los mutantes con el LPS alterado.

C.1. Caracterización *in vitro*.

;) **Aislamiento del LPS y corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida.** Los LPS de las diferentes cepas se aislaron empleando la técnica de Valverde y colaboradores (1997) basada en la afinidad del LPS a resinas de polimixina B. Los LPS que se obtuvieron fueron analizados en corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida con SDS.

;) **Análisis de la reactividad de las diferentes estructuras de LPS frente a sueros de infectados. Inmunodetecciones (Western blot).** Se realizaron corridas electroforéticas de LPS wild type y de LPS con estructura rugosa profunda, las cuales se transfirieron a membranas de naturaleza adecuada para luego hacer reaccionar los diferentes LPS con sueros obtenidos de pacientes con infección aguda y de pacientes con infección crónica. De esta manera confrontaron los resultados obtenidos con la hipótesis sobre la variación de la estructura del LPS como respuesta adaptativa/selección frente a entornos inmunológicos diferentes.

;) **Adhesión, invasión y supervivencia dentro de las células de mucosa respiratoria.** Se empleó como sistema de ensayo a células de línea de epitelio respiratorio humano A549 (ATCC CRL-185). La adhesión de las bacterias a las células epiteliales se analizó según el protocolo publicado por van den Berg y col. (1999) (343). El análisis de la invasión y sobrevida intracelular se llevará a cabo según lo descrito por Schiper y col. (1994), con algunas modificaciones. Las bacterias adheridas se analizaron por técnicas microscópicas por tinción con cristal violeta. En experimentos separados, la sobrevida se analizará por recuento de viables a distintos tiempos de incubación.

C.2. Caracterización *in vivo*.

;) **Determinación de la dosis letal cincuenta:** Se inocularon los ratones BALB/c con las distintas diluciones seriadas de la suspensión bacteriana. Se determinó el número de decesos en el transcurso de 30 días y a partir de estos datos se estimó la LD50.

;) **Colonización en pulmones:** Se realizaron infecciones intranasales con suspensiones bacterianas en concentraciones subletales. Los ratones infectados fueron sacrificados una hora después de la infección y varios días después de la misma. Se obtuvieron extractos de los pulmones homogenizados de los ratones infectados, los que fueron plaqueados en medios sólidos para el recuento de las unidades formadoras de colonias luego de tres días de incubación.

;) **Persistencia:** Los ratones infectados como se describió anteriormente fueron sacrificados a distintos tiempos. Sobre los homogenados de pulmón fueron analizados por reacciones de PCR empleando primers específicos para la región promotora del gen estructural de la flagelina de *B. bronchiseptica* (subunidad estructural del flagelo).

D. Análisis de la relación entre la producción/secreción de proteínas de la familia RTC (AC-Hly) y la biosíntesis del LPS de *B. bronchiseptica*.

Se estudió el efecto de la mutación en el LPS sobre la toxina RTX (AC-Hly) de Bordetella. Se analizó la actividad ciclasa y hemolítica intra y extracelular sobre mutantes de *B. bronchiseptica* que presenten alterada la estructura del LPS. Se separó y visualizó mediante corridas electroforéticas la presencia de AC-Hly tanto en células como en sobrenadantes libres de células. En paralelo en mutantes defectivos en la expresión de adenilato ciclasa se analizó la posibilidad de cambios en la estructura del LPS

E. Ensayos *in vivo* tendientes a superar la deficiencia en la adhesión de las cepas que presentan alterado el LPS.

Teniendo en cuenta que el LPS actúa como adhesina en numerosos procesos infecciosos desencadenados por diversos patógenos bacterianos es esperable que un defecto en la estructura del LPS de *B. bronchiseptica* también altere la etapa de adhesión de este patógeno a células del hospedador. Es por ello que para superar esta etapa temprana fue previsto realizar los siguientes ensayos tendientes a lograr que la infección evolucione hacia un estadio de cronicidad que es en donde se quiere evaluar el rol del LPS con estructura rugosa profunda.

En particular se ensayó:

i) **Aumento de la dosis subletal inicial.** Se pretendió de esta manera saturar el sistema inmune del hospedador a fin de permitir que una porción de la población inoculada pueda avanzar en la infección.

ii) **Modificación en el volumen de inoculación.** Los volúmenes empleados tradicionalmente garantizan la llegada del inóculo a la zona intranasal del animal. Aumentando el volumen de inoculación se intentó lograr que las bacterias alcancen el tejido pulmonar de manera directa evitando los pasos previos de adhesión y colonización del tejido traqueal.

iii) **Inhibición farmacológica del movimiento ciliar del hospedador.** Se manipuló farmacológicamente el movimiento ciliar del animal a fin de impedir la eliminación de la bacteria por este mecanismo. Para ello se empleó un anestésico como el pentobarbital o un anticolinérgico como la atropina.

iv) **Inoculación de bacterias conteniendo su LPS alterado en ratones neutropénicos.** Con el fin de eliminar uno de los factores posibles de erradicación de la bacteria durante la infección se utilizó ciclofosfamida, ya reportada previamente como agente neutropénico.

v) **Inoculación de ratones con bacterias conteniendo su LPS alterado cultivadas en condiciones en donde se favorece la expresión de adhesinas.** Las bacterias crecidas en este tipo de condiciones expresan adhesinas que podrían favorecer el proceso de adhesión afectado en el mutante con el LPS alterado. Las bacterias crecidas a 22°C se inocularon en un grupo de ratones intranasalmente y se determinó la presencia de bacterias a las 72 horas post inoculación.

«) **Coinoculación del mutante con el LPS alterado junto a la cepa parental Bb9.73.** La cepa parental secreta la medio extracelular LPS completo. Es esperable que esta liberación *in vivo* pueda complementar la ausencia de un LPS completo en el mutante.

F. Análisis de la selección/variación de la estructura del LPS durante la infección de ratones con título de anticuerpos anti-LPS.

La presencia de anticuerpos anti-LPS se detectó en niveles altos en pacientes con infecciones crónicas por lo que este entorno inmunológico dentro del hospedador sea quizás el responsable de la selección/variación de la estructura del LPS. Para avanzar sobre el conocimiento de este aspecto se inyectaron ratones con LPS purificado o con suero anti-LPS. Una vez confirmado por el ELISA un título adecuado de anticuerpo anti-LPS se inoculará por vía intranasal una suspensión bacteriana en fase virulenta. Posteriormente a diferentes tiempos post inoculación se sacrificarán los ratones y se recuperarán las colonias de los pulmones para luego poder evaluar la estructura del LPS.

G. Estudio de la actividad proapoptótica de los LPS presentes en las cepas parentales y rugosos profundo.

Se evaluó en cultivos celulares la capacidad que presentan los diferentes LPS para inducir un aumento en la proporción de células apoptóticas. Se utilizaron células derivadas de epitelio pulmonar (A549) y células de la serie blanca como monocitos y neutrófilos de donadores sanos y células derivadas de monocitos (U937). La presencia de células en procesos apoptóticos fue determinada mediante el empleo de dos kits comerciales: Cell Death Detection ELISA^{PLUS} de RocheTM y Annexin-V-Fluos Staining Kit de RocheTM.

Significado de esta investigación

La compleja interacción entre un patógeno y su hospedador constituye la base del desarrollo de una enfermedad infecciosa. A través del conocimiento molecular de esta interacción es posible identificar los factores bacterianos asociados a la virulencia y las estrategias de defensa desencadenadas por el hospedador. Esta información resulta ser esencial para el diseño de nuevas herramientas médicas preventivas más eficaces. Si bien en el caso de *Bordetella* spp se ha avanzado considerablemente en la definición de componentes involucrados en la interacción microorganismo-hospedador, resta aún realizar una exploración más acabada del proceso infeccioso incluyendo las etapas de persistencia y cronicidad. En el presente trabajo se mostrarán los resultados alcanzados sobre el rol de componentes superficiales, en particular del lipopolisacárido de *B. bronchiseptica* en el desarrollo de la enfermedad. Hemos realizado nuestros estudios a través de la construcción y caracterización de mutantes defectivos en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del LPS. Hemos analizado tanto la relación entre la estructura del LPS y la expresión de otros factores de virulencia como el rol del LPS *in vitro* en la adhesión, invasión y sobrevivencia del patógeno en células del hospedador.

Hemos utilizado el modelo de infección de *Bordetella* en ratones para evaluar *in vivo* la contribución del LPS en la colonización y persistencia de la bacteria en el hospedador. Como resultado de estos estudios se espera haber contribuido en la definición a nivel molecular de los mecanismos involucrados tanto en la persistencia como en la adaptación de la bacteria a los diferentes entornos dentro del hospedador.

Referencias.

1. **Abramson T., Kedem H., Reiman D.A. 2001.** Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 69:2650-8.
2. **Ackers J.P., Dolby J.M. 1972.** The antigen of *Bordetella pertussis* that induces bactericidal antibody and its relationship to protection of mice. *J Gen Microbiol.* 70:371-82.
3. **Alfano M., Vallanti G., Biswas P., Bovolenta C., Vicenzi E., Mantelli B., Pushkarsky T., Rappuoli R., Lazzarin A., Bukrinsky M., Poli G. 2001.** The binding subunit of *pertussis* toxin inhibits HIV replication in human macrophages and virus expression in chronically infected promonocytic U1 cells. *J Immunol.* 166:1863-70.
4. **Allen A., Maskell D. 1996.** The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 19:37-52.
5. **Allen A.G., Isobe T., Maskell D.J. 1998.** Identification and cloning of *waaF* (*rfaF*) from *Bordetella pertussis* and use to generate mutants of *Bordetella* spp. with deep rough lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* 180:35-40.
6. **Allen A.G., Thomas R.M., Cadisch J.T., Maskell D.J. 1998.** Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 29:27-38.
7. **Alonso S., Pethe K., Mielcarek N., Raze D., Locht C. 2001.** Role of ADP-ribosyltransferase activity of *pertussis* toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun.* 69:6038-43.
8. **Anderson K.V. 2000.** Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 12:13-9.
9. **Andersson S.G.E., Kurland C.G. 1998.** Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 6:263-8.
10. **Antoine R., Alonso S., Raze D., Coutte L., Lesjean S., Willery E., Locht C., Jacob-Dubuisson F. 2000.** New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 182:5902-5.
11. **Antoine R., Raze D., Locht C. 2000.** Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol.* 2000 Oct;290(4-5):301-5.
12. **Arico B., Gross R., Smida J., Rappuoli R. 1987.** Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol Microbiol.* 1: 301-8.
13. **Arico B., Miller J.F., Roy C., Stibitz S., Monack D., Falkow S., Gross R., Rappuoli R. 1989.** Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:6671-5.
14. **Arico B., Scarlato V., Monack D.M., Falkow S., Rappuoli R. 1991.** Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 5: 2481-91.
15. **Armstrong S.K., Parker C.D. 1986.** Surface proteins of *Bordetella pertussis*: comparison of virulent and avirulent strains and effects of phenotypic modulation. *Infect Immun.* 54: 308-14.
16. **Arp L.H., Cheville N.F. 1984.** Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res.* 1984 Oct; 45(10): 2196-200.
17. **Austin E.A., Graves J.F., Hite L.A., Parker C.T., Schnaitman C.A. 1990.** Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J Bacteriol.* 172:5312-25.
18. **Baca O.G., Li Y.P., Kumar H. 1994.** Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol.* 2: 476-80.
19. **Backhed F., Normark S., Schweda E.K., Oscarson S., Richter-Dahlfors A. 2003.** Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect.* 5: 1057-63.
20. **Banemann A., Deppisch H. and Gross R. 1998.** The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 66:5607-12.
21. **Barenkamp S.J., St Geme J.W. 3rd. 1994.** Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun.* 62: 3320-8.
22. **Barry E.M., Weiss A.A., Ehrmann I.E., Gray M.C., Hewlett E.L., Goodwin M.S. 1991.** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol.* 173:720-6.
23. **Bassinat L., Gueirard P., Maitre B., Housset B., Gounon P., Guiso N. 2000.** Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 68:1934-41.
24. **Bauer M.E., Welch R.A. 1997.** Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun.* 65:2218-24.

25. Beattie D.T., Mahan M.J., Mekalanos J.J. 1993. Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 175:519-27.
26. Beier D., Schwarz B., Fuchs T.M., Gross R. 1995. In vivo characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. J Mol Biol. 248:596-610.
27. Belunis C.J., Mdululi K.E., Raetz C.R., Nano F.E. 1992. A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. J Biol Chem. 267:18702-7.
28. Belunis C.J., Raetz C.R. 1992. Biosynthesis of endotoxins. Purification and catalytic properties of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 267:9988-97.
29. Berggard K., Johnsson E., Mooi F.R., Lindahl G. 1997. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. Infect Immun. 65:3638-43.
30. Bernardini M.L., Mounier J., d'Hauteville H., Coquis-Rondon M., Sansonetti P.J. 1989. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:3867-71.
31. Beutler B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Curr Opin Immunol. 12:20-6.
32. Binet R., Létoffé S., Ghigo J.M., Delepelaire P., Wandersm C. 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters – a review. Gene. 192:7-11.
- 33.
34. Bliska J.B., Guan K.L., Dixon J.E., Falkow S. 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 1187-91.
35. Bock A., Gross R. 2002. The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. Eur J Biochem. 269: 3479-84.
36. Bokoch G.M., Gilman A.G. 1984. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by *pertussis* toxin. Cell. 39: 301-8.
37. Bootsma H., Cummings C., Miller J., Relman D., Van de Pas S. 2002. Global Expression Analysis of the *Bordetella* Virulence Regulon. 2002 American Society of Microbiology General Meeting.
38. Bordet J. 1906. Ann Inst Pasteur (Paris) 20:731-741
39. Bordet J. 1909 J Med Microbiol 4:51-61;
40. Boschwitz J.S., van der Heide H.G., Mooi F.R., Relman D.A. 1997. *Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene fimA. J Bacteriol. 179:7882-5.
41. Boucher P.E., Maris A.E., Yang M.S., Stibitz S. 2003. The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. Mol Cell. 11: 163-73.
42. Boucher P.E., Menozzi F.D., Locht C. 1994. The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. J Mol Biol. 241:363-77.
43. Boucher P.E., Murakami K., Ishihama A., Stibitz S. 1997. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the fha promoter. J Bacteriol. 179:1755-63.
44. Boucher P.E., Stibitz S. 1995. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the *pertussis* toxin promoter of *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 177(22):6486-91.
45. Boursaux-Eude C., Guiso N. 2000. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun. 68:4815-7. Erratum in: Infect Immun 2000. 68:7214.
46. Bradford P.G., Rubin R.P. 1985. *Pertussis* toxin inhibits chemotactic factor-induced phospholipase C stimulation and lysosomal enzyme secretion in rabbit neutrophils. FEBS Lett. 183: 317-20.
47. Brandt S.J., Dougherty R.W., Lapetina E.G., Niedel J.E. 1985. *Pertussis* toxin inhibits chemotactic peptide-stimulated generation of inositol phosphates and lysosomal enzyme secretion in human leukemic (HL-60) cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 82: 3277-80.
48. Brazas R., Davie E., Farewell A., Rothfield L.I. 1991. Transcriptional organization of the rfaGBIJ locus of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 173: 6168-73.
49. Brennan M.J., Hannah J.H., Leininger E. 1991. Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. J Biol Chem. 266:18827-31.
50. Brockmeier S.L., Register K.B., Magyar T., Lax A.J., Pullinger G.D., Kunkle R.A. 2002. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. Infect Immun. 70:481-90.
51. Buchmeier N.A., Heffron F. 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 59: 2232-8.
52. Burns D.L. 1999. Biochemistry of type IV secretion. Curr Opin Microbiol. 2: 25-9.
53. Burns V.C., Pishko E.J., Preston A., Maskell D.J., Harvill E.T. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. Infect Immun. 71:86-94.

54. Caroff M., Aussel L., Zarrouk H., Martin A., Richards J.C., Therisod H., Perry M.B., Karibian D. 2001. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *J Endotoxin Res.* 7: 63-8.
55. Caroff M., Brisson J., Martin A., Karibian D. 2000. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477:8-14.
56. Caroff M., Chaby R., Karibian D., Perry J., Deprun C., Szabo L. 1990. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol.* 172:1121-8.
57. Cassidy P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K.M., Popovic T. 2000. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis.* 182:1402-8.
58. Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science.* 262:539-44.
59. Charles I., Fairweather N., Pickard D., Beesley J., Anderson R., Dougan G., Roberts M. 1994. Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology.* 140:3301-8.
60. Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Charfield S., Smith M., Novotny P., Fairweather N. 1998. Molecular cloning and analysis of P. 69, a vir-controlled protein from *Bordetella pertussis*. *Tokai J Exp Clin Med.* 13 Suppl:227-34.
61. Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Chatfield S., Smith M., Novotny P., Morrissey P., Fairweather N.F. 1989. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3554-3558.
62. Cheng L.W., Schneewind O. 2000. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol.* 8:214-20.
63. Cheng Q., Stafslien D., Purushotaman S.S., Clearly P. 2002. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun.* 70:2408-13.
64. Choi S.H., Greenberg E.P. 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:11115-9.
65. Christie P.J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.* 179:3085-94.
66. Christie P.J., Vogel J.P. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8:354-60.
67. Collazo C.M., Galan J.E. 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*—a review. *Gene.* 192: 51-9.
68. Cone T.C. Jr. 1970. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics.* 46:522.
69. Cookson B.T., Vandamme P., Carlson L.C., Larson A.M., Sheffield J.V., Kersters K., Spach D.H. 1994. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol.* 32: 2569-71.
70. Coote J.G. 1991. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 137:2493-503.
71. Coote J.G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 8: 137-61.
72. Cornelis G.R., Van Gijsegem F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 54:735-74.
73. Cornelis G.R., Wolf-Watz H. 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* 23: 861-7.
74. Cossart P., Lecuit M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17: 3797-806
75. Cotter P.A., DiRita V.J. 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* 54:519-65.
76. Cotter P.A., Jones A.M. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 11: 367-73.
77. Cotter P.A., Miller J.F. 1994. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 62:3381-90.
78. Cotter P.A., Miller J.F. 1997. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 24: 671-85.
79. Cotter P.A., Miller J.F. 1998. *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 1: 17-26.
80. Cotter P.A., Yuk M.H., Mattoo S., Akerley B.J., Boschwitz J., Relman D.A., Miller J.F. 1998. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 66:5921-9.
81. Coutte L., Alonso S., Reveneau N., Willery E., Quatannens B., Loch C., Jacob-Dubuisson F. 2003. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med.* 197:735-42.

82. Coutte L., Antoine R., Drobecq H., Locht C., Jacob-Dubuisson F. 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 20: 5040-8.
83. Cover T.L., Tummuru M.K., Cao P., Thompson S.A., Blaser M.J. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem.* 269:10566-73.
84. Cowell J.L., Hewlett E.L., Manclark C.R. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 25:896-901.
85. Creeger E.S., Schulte T., Rothfield L.I. 1984. Regulation of membrane glycosyltransferases by the *sfrB* and *rfaH* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 259: 3064-9.
86. Cuzzoni A., Pedroni P., Riboli B., Grandi G., de Ferra F. 1990. Nucleotide sequence of the *fim3* gene from *Bordetella pertussis* and homology to *fim2* and *fimX* gene products. *Nucleic Acids Res.* 18:1640.
87. de Bernard M., Arico B., Papini E., Rizzuto R., Grandi G., Rappuoli R., Montecucco C. 1997. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol.* 26:665-74.
88. de la Fuente J., Albo C., Rodriguez A., Sopena B., Martinez C. 1994. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with AIDS. *Thorax.* 49:719-20.
89. Delisse-Gathoye A.M., Locht C., Jacob F., Raaschou-Nielsen M., Heron I., Ruelle J.L., de Wilde M., Cabezon T. 1990. Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 58:2895-905.
90. Deora R., Bootsma H.J., Miller J., Cotter P.A. 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Molec Microbiol.* 40:669-83.
91. de Bernard M., Arico B., Papini E., Rizzuto R., Grandi G., Rappuoli R., Montecucco C. 1997. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol.* 26:665-74.
92. Di Fabio J.L., Caroff M., Karibian D., Richards J.C., Perry M.B. 1992. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 76:275-81.
93. Domenighini M., Relman D., Capiou C., Falkow S., Prugnola A., Scarlato V., Rappuoli R. 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol.* 4:787-800.
94. D'Orazio S.E., Thomas V., Collins C.M. 1996. Activation of transcription at divergent urea-dependent promoters by the urease gene regulator UreR. *Mol Microbiol.* 21:643-55.
95. Dunny G.M., Leonard B.A. 1997. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 51:527-64.
96. Dworkin M.S., Sullivan P.S., Buskin S.E., Harrington R.D., Olliffe J., MacArthur R.D., Lopez C.E. 1999. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 28(5):1095-9.
97. Emsley P., Charles I.G., Fairweather N.F., Isaacs N.W. 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature.* 381:90-2.
98. Everest P., Li J., Douce G., Charles I., De Azavedo J., Chatfield S., Dougan G., Roberts M. 1996. Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology.* 142:3261-8.
99. Ezzell J.W., Dobrogosz W.J., Kloos W.E., Manclark C.R. 1981. Phase-shift markers in the genus *Bordetella*: loss of cytochrome d-629 in phase IV variants. *Microbios.* 31:171-81.
100. Falbo V., Pace T., Picci L., Pizzi E., Caprioli A. 1993. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 61:4909-14.
101. Farizo K.M., Cafarella T.G., Burns D.L. 1996. Evidence for a ninth gene, *ptII*, in the locus encoding the *pertussis* toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PtlI-PtlF complex. *J Biol Chem.* 271:31643-9.
102. Farizo K.M., Huang T., Burns D.L. 2000. Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of *pertussis* toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 68:4049-54.
103. Fernandez R.C., Weiss A.A. 1994. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* 62:4727-38.
104. Fernandez R.C., Weiss A.A. 1998. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 163:57-63.
105. Ferry P. 1910. *Am Vet Rev* 37:499-504;
106. Ferry P. 1912. *Vet* 68:376-391
107. Fingerhann M., Fernández J., Sisti F., Llanos C., Rocca L., Gatti B., Mooi F., Rodriguez M.E. and Hozbor D. 2002. Phenotypic And Genotypic Characterization Of *Bordetella pertussis* Clinical Isolates Obtained In Argentina. Seventh International Symposium on *Pertussis*: Genome, Pathogenesis, and Immunity. Cambridge, UK.
108. Finn T.M., Amsbaugh D.F. 1998. Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun.* 66:3985-9.

109. Finn T.M., Li Z., Kocsis E. 1995. Identification of a *Bordetella pertussis* bvg-regulated porin-like protein. J Bacteriol. 177:805-9.
110. Finn T.M., Shahin R., Mekalanos J.J. 1991. Characterization of vir-activated TnpH gene fusions in *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 59:3273-9.
111. Finn T.M., Stevens L.A. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. Mol Microbiol. 16:625-634.
112. Flak T.A., Goldman W.E. 1996. Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. Am J Respir Crit Care Med. 154:S202-6.
113. Frehel C., de Chastellier C., Lang T., Rastogi N. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. Infect Immun. 52:252-62.
114. Fry N.K., Neal S., Harrison T.G., Miller E., Matthews R., George R.C. 2001. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. Infect Immun. 2001 Sep;69(9):5520-8. Erratum in: Infect Immun. 69:6564.
115. Fuchslocher B., Millar L.L., Cotter P.A. 2003. Comparison of *bipA* alleles within and across *Bordetella* species. Infect Immun. 71:3043-52.
116. Funke G., Hess T., von Graevenitz A., Vandamme P. 1996. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. J Clin Microbiol. 34:966-9.
117. Gadea I., Cuenca-Estrella M., Benito N., Blanco A., Fernandez-Guerrero M.L., Valero-Guillen P.L., Soriano F. 2000. *Bordetella hinzii*, a "new" opportunistic pathogen to think about. J Infect. 40:298-9.
118. Gao L.Y., Kwaik Y.A. 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. Trends Microbiol. 8:306-13.
119. Garcia Vescovi E., Soncini F.C., Groisman E.A. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. Cell. 84: 165-74.
120. Gentile F., Knipling L.G., Sackett D.L., Wolff J. 1990. Invasive adenyl cyclase of *Bordetella pertussis*. Physical, catalytic, and toxic properties. J Biol Chem. 265:10686-92.
121. Gerlach G., von Wintzingerode F., Middendorf B., Gross R. 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. Microbes Infect. 3:61-72.
122. Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R. 1997. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. Infect Immun. 65:4222-4228.
123. Glaser P., Ladant D., Sezer O., Pichot F., Ullmann A., Danchin A. 1988. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2:19-30.
124. Glaser P., Sakamoto H., Bellalou J., Ullmann A., Danchin A. 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. EMBO J. 7:3997-4004.
125. Goodnow R.A. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev. 44:722-38.
126. Gordon V.M., Young W.W. Jr, Lechler S.M., Gray M.C., Leppla S.H., Hewlett E.L. 1989. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. J Biol Chem. 264:14792-6.
127. Greenlee D.V., Andreassen T.J., Storm D.R. 1982. Calcium-independent stimulation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by calmodulin. Biochemistry. 21:2759-64.
128. Groisman E.A. 1998. The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. Bioessays. 20: 96-101.
129. Gross R., Rappuoli R. 1988. Positive regulation of *pertussis* toxin expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 85:3913-7.
130. Guedin S., Willery E., Tommassen J., Fort E., Drobecq H., Locht C., Jacob-Dubuisson F. 2000. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J Biol Chem. 275:30202-10.
131. Gueirard P. Infection respiratoire à *Bordetella bronchiseptica*: facteurs impliqués, réponses immunes, conséquences vaccinales. 1995. Tesis Doctoral. Université Paris V. Faculté de Médecine Cochin. France.
132. Gueirard P., Druilhe A., Pretolani M., Guiso N. 1988. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. Infect Immun. 66:1718-25.
133. Gueirard P., Guiso N. 1993. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun. 61:4072-8.
134. Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. FEMS Microbiol Lett. 162:331-337.
135. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. J Clin Microbiol. 33:2002-2006.
136. Guiso N., Rocancourt M., Szatanik M., Alonso J.M. 1989. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. Microb Pathog. 7:373-80.
137. Guiso N., Grimpel E., Anjak I., Begue P. 1993. Western blot analysis of antibody responses of young infants to *pertussis* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 12:596-600.

138. Guiso N., Szatanik M., Rocancourt M. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microb Pathog.* 11:423-31.
139. Gzyl A., Augustynowicz E., van Loo I., Slusarczyk J. 2001. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine.* 20:299-303;
140. Haas R., Meyer T.F. 1986. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: Evidence for gene conversion. *Cell* 44:107-115;
141. Hackett M., Guo L., Shabanowitz J., Hunt D.F., Hewlett E.L. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science.* 266:433-5.
142. Hale T.L. 1991. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol Rev.* 55:206-24.
143. Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-14.
144. Hannah J.H., Menozzi F.D., Renauld G., Loch C., Brennan M.J. 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun.* 62:5010-9.
145. Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 1999. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun.* 67:6109-18.
146. Harvill E.T., Preston A., Cotter P.A., Alien A.G., Maskell D.J., Miller J.F. 2000. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun.* 68:6720-8.
147. Hazenbos W.L., van den Berg B.M., Geuijen C.W., Mooi F.R., van Furth R. 1995. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 1995 155:3972-8.
148. Heinrichs D.E., Yethon J.A., Whitfield C. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 30:221-32.
149. Heiss L.N., Lancaster J.R. Jr, Corbett J.A., Goldman W.E. 1994. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:267-70.
150. Heiss L.N., Moser S.A., Unanue E.R., Goldman W.E. 1993. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun.* 61:3123-8.
151. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 6:370-8.
152. Hensel M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 36(5):1015-23.
153. Heveker N., Ladant D. 1997. Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. Implications for the mechanism of toxin entry into target cells. *Eur J Biochem.* 243:643-9.
154. Hewlett E.L., Gordon V.M., McCaffery J.D., Sutherland W.M., Gray M.C. 1989. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem.* 264:19379-84.
155. Heymann P., Gerads M., Schaller M., Dromer F., Winkelmann G., Ernst J.F. 2002. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferri-chrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun.* 70:5246-55.
156. Holden M.T., Ram Chhabra S., de Nys R., Stead P., Bainton N.J., Hill P.J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G.P., Stewart G.S., Bycroft B.W., Kjelleberg S., Williams P. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 33:1254-66.
157. Horiguchi Y., Inoue N., Masuda M., Kashimoto T., Katahira J., Sugimoto N., Matsuda M. 1997. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11623-6.
158. Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M. 1993. Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 61:3611-5.
159. Horiguchi Y., Sugimoto N., Matsuda M. 1994. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates protein synthesis in an osteoblastic clone, MC3T3-E1 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 120:19-22.
160. Horsburgh M.J., Ingham E., Foster S.J. 2001. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol.* 183:468-75.
161. Horwitz M.A., Maxfield F.R. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol.* 99:1936-43.
162. Hoshijima M., Kondo J., Kikuchi A., Yamamoto K., Takai Y. 1990. Purification and characterization from bovine brain membranes of a GTP-binding protein with a Mr of 21,000, ADP-ribosylated by an ADP-ribosyltransferase contaminated in botulinum toxin type C1—identification as the rhoA gene product. *Brain Res Mol Brain Res.* 7:9-16.
163. Hozbor D., Rodriguez M.E., Fernandez J., Lagares A., Guiso N., Yantom O. 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol.* 38:273-8.

164. Hozbor D., Rodriguez M.E., Samo A., Jlagares A., Yantom O. 1993. Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. *Res Microbiol.* 144:201-9.
165. Hozbor D., Rodriguez M.E., Yantom O. 1994. Use of cyclodextrin as an agent to induce excretion of *Bordetella pertussis* antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 9:117-24.
166. Hueck C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:379-433.
167. Huitgren S.J., Abraham S., Caparon M., Falk P., St Geme J.W. 3rd, Normark S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell.* 4; 73:887-901.
168. Hynes R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
169. Ishibashi Y., Claus S., Reiman D.A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 180:1225-33.
170. Ishibashi Y., Reiman D.A., Nishikawa A. 2001. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog.* 30:279-88.
171. Isobe T., White K.A., Allen A.G., Peacock M., Raetz C.R., Maskell D.J. 1999. *Bordetella pertussis* waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an *Escherichia coli* waaA mutation. *J Bacteriol.* 181:2648-51.
172. Jacob-Dubuisson F., Buisine C., Mielcarek N., Clement E., Menozzi F.D., Locht C. 1996. Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 19:65-78.
173. Jacob-Dubuisson F., El-Hamel C., Saint N., Guedin S., Willery E., Molle G., Locht C. 1999. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem.* 274:37731-5.
174. Jacob-Dubuisson F., Kehoe B., Willery E., Reveneau N., Locht C., Reiman D.A. 2000. Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology.* 146:1211-21.
175. Jedrzejewski M.J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Molec Biol Rev.* 65:187-207.
176. Jimenez-Lucho V.E., Joiner K.A., Foulds J., Frank M.M., Leive L. 1987. C3b generation is affected by the structure of the O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide from *Salmonellae*. *J Immunol.* 139:1253-9.
177. Jungnitz H., West N.P., Walker M.J., Chhatwal G.S., Guzman C.A. 1998. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and *in vivo* persistence. *Infect Immun.* 66:4640-50.
178. Kania S.A., Rajeev S., Burns E.H. Jr, Odom T.F., Holloway S.M., Bemis D.A. 2000. Characterization of fimN, a new *Bordetella bronchiseptica* major fimbrial subunit gene. *Gene.* 256:149-55.
179. Karimova G., Bellalou J., Ullmann A. 1996. Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyaA* gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 20:489-96.
180. Karimova G., Fayolle C., Gmira S., Ullmann A., Leclerc C., Ladant D. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the *in vivo* delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12532-7.
181. Karkhanis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J., Carlo D.J. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem.* 85:595-601.
182. Kashimoto T., Katahira J., Cornejo W.R., Masuda M., Fukuoh A., Matsuzawa T., Ohnishi T., Horiguchi Y. 1999. Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Infect Immun.* 67:3727-32.
183. Kasuga, T., Nakase Y., Ukishima K. And Takatsu K. 1954. Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. *Arch Exp Med* 27:57-62
184. Kattar M.M., Chavez J.F., Limaye A.P., Rassouljian-Barrett S.L., Yarfitz S.L., Carlson L.C., Houze Y., Swanzy S., Wood B.L., Cookson B.T. 2000. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol.* 38:789-94.
185. Kessler E., Safrin M. 1988. Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol.* 170:5241-7.
186. Khelef N., Bachelet C.M., Vargaftig B.B., Guiso N. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun.* 62:2893-900. Erratum en: *Infect Immun* 1994 62:5707.
187. Khelef N., Guiso N. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 134:27-32.
188. Khelef N., Sakamoto H., Guiso N. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog.* 12:227-35.

189. Khelef N., Zychlinsky A., Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4064-71.
190. King A.J., Berbers G., van Oirschot H.F., Hoogerhout P., Knipping K., Mooi F.R. 2001. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology.* 147:2885-95.
191. Kinnear S.M., Boucher P.E., Stibitz S., Carbonetti N.H. 1999. Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 181:5234-41.
192. Kitten T., Barrera A.V., Barbour A.G. 1993. Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol.* 175:2516-22.
193. Klauser T., Kramer J., Otzelberger K., Pohlner J., Meyer T.F. 1993. Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol.* 234:579-93.
194. Klauser T., Pohlner J., Meyer T.F. 1993. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays.* 15:799-805.
195. Knapp S., Mekalanos J.J. 1988. Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 170:5059-5066.
196. Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E., Aizawa S.I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella* typhimurium type III protein secretion system. *Science.* 280:602-5.
197. Kuhn M., Goebe W. 1998. Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Microbiol.* 6:11-5.
198. Lacey B.W. 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.* 58:57-93 Lad 1985 PNAS 82:869.
199. Ladant D. 1988. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem.* 263:2612-8.
200. Ladant D., Michelson S., Sarfati R., Gilles A.M., Predeleanu R., Barzu O. 1989. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 264:4015-20.
201. Ladant D., Ullmann A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7:172-6.
202. Lambert-Buisine C., Willery E., Locht C., Jacob-Dubuisson F. 1998. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 28:1283-93.
203. Le Blay K., Gueirard P., Guiso N., Chaby R. 1997. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 143:1433-1441.
204. Lebbar S., Caroff M., Szabo L., Merienne C., Szilogyi L. 1994. Structure of a hexasaccharide proximal to the hydrophobic region of lipopolysaccharides present in *Bordetella pertussis* endotoxin preparations. *Carbohydr Res.* 259:257-75.
205. Lee C.A. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol.* 5:148-56.
206. Leeds *et al.*, 1996;
207. Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P., Brennan M.J. 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:345-9.
208. Leslie P.H., Gardner A.D. 1931. The phases of *Haemophilus pertussis*. *J. Hyg.* 31:423-34; Leusch *et al* *Infect Immun* 58 3621 1990
209. Lesnick ML, Guiney DG. 2000. The best defense is a good offense—*Salmonella* deploys an ADP-ribosylating toxin. *Trends Microbiol.* 9:2-4
210. Li J., Fairweather N.F., Novotny P., Dougan G., Charles I.G. 1992. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J Gen Microbiol.* 138:1697-705.
211. Li L.J., Dougan G., Novotny P., Charles I.G. 1991. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 5:409-17.
212. Liang-Takasaki C.J., Saxen H., Makela P.H., Leive L. 1983. Complement activation by polysaccharide of lipopolysaccharide: an important virulence determinant of *Salmonellae*. *Infect Immun.* 41:563-9.
213. Livey I., Duggleby C.J., Robinson A. 1987. Cloning and nucleotide sequence analysis of the serotype 2 fimbrial subunit gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 1:203-9.
214. Livey I., Wardlaw A.C. 1984. Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol.* 17:91-103.
215. Locht C., Antoine R. 1995. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie.* 77:333-40.
216. Locht C., Antoine R., Jacob-Dubuisson F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol.* 4:82-9.

217. Locht C., Antoine R., Veithen A., Raze D. 2000. *Pertussis* toxin: structure-function relationship. Handbook of Experimental Pharmacology. Bacterial proteins toxins, vol 145 Locht C., Antoine R. A proposed mechanism of ADP-ribosylation by the *pertussis* toxin S1 subunit. 1995. *Biochimie* 77:333-340
218. Locht C., Geoffroy M.C., Renaud G. 1992. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J.* 11:3175-83.
219. Loveless B.J., Saier M.H. Jr. 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol.* 14:113-23.
220. Luker K.E., Collier J.L., Kolodziej E.W., Marshall G.R., Goldman W.E. 1993. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2365-9.
221. Luker K.E., Tyler A.N., Marshall G.R., Goldman W.E. 1995. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in *pertussis*. *Mol Microbiol.* 16:733-43.
222. MacGowan 1911. *J Pathol Bacteriol* 15:372-426,
223. Makhov A.M., Hannah J.H., Brennan M.J., Trus B.L., Kocsis E., Conway J.F., Wingfield P.T., Simon M.N., Steven A.C. 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol.* 241:110-24.
224. Makoff A.J., Oxer M.D., Ballantine S.P., Fairweather N.F., Charles I.G. 1990. Protective surface antigen P69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y).* 8:1030-3.
225. Manetti R., Arico B., Rappuoli R., Scarlato V. 1994. Mutations in the linker region of BvgS abolish response to environmental signals for the regulation of the virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Gene.* 150:123-7. Erratum en: *Gene* 155:147.
226. Marchitto K.S., Smith S.G., Locht C., Keith J.M. 1987. Nucleotide sequence homology to *pertussis* toxin gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun.* 55:497-501.
227. Marques R.R., Carbonetti N.H. 1997. Genetic analysis of *pertussis* toxin promoter activation in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 24:1215-24.
228. Martinez de Tejada G., Cotter P.A., Heininger U., Camilli A., Akerley B.J., Mekalanos J.J., Miller J.F. 1998. Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun.* 66:2762-8.
229. Masuda M., Betancourt L., Matsuzawa T., Kashimoto T., Takao T., Shimonishi Y., Horiguchi Y. 2000. Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* 19:521-30.
230. Masuda M., Minami M., Shime H., Matsuzawa T., Horiguchi Y. 2002. *In vivo* modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 70:998-1001.
231. Matsuzawa T., Kashimoto T., Katahira J., Horiguchi Y. 2002. Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 70:3427-32.
232. Mattoo S., Miller J.F., Cotter P.A. 2000. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun.* 68:2024-33.
233. Mazengia E., Silva E.A., Peppe J.A., Timperi R., George H. 2000. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol.* 38:2330-3.
234. McGuirk P., Mills K.H. 2000. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol.* 30:415-22.
235. Meade B.D., Kind P.D., Ewell J.B., McGrath P.P., Manclark C.R. 1984. *In vitro* inhibition of murine macrophage migration by *Bordetella pertussis* lymphocytosis-promoting factor. *Infect Immun.* 45:718-25.
236. Mekalanos J.J., Peterson K.M., Finn T., Knapp S. 1988. The pathogenesis and immunology of *Vibrio cholerae* and *Bordetella pertussis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 54:379-87
237. Menestrina G., Moser C., Pellet S., Welch R. 1994. Pore formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology.* 87:249-67.
238. Menestrina G., Serra M.D., Prevost G. 2001. Mode of action of beta barrel pore forming toxins of the staphylococcal alpha hemolysin family. *Toxicon.* 39:1661-72.
239. Menozzi F.D., Mutombo R., Renaud G., Gantiez C., Hannah J.H., Leininger E., Brennan M.J., Locht C. 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 62:769-78.
240. Merkel T.J., Barros C., Stibitz S. 1998. Characterization of the bvgR locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 180:1682-90.
241. Merkel T.J., Boucher P.E., Stibitz S., Grippe V.K. 2003. Analysis of bvgR Expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 185:6902-12.
242. Merkel T.J., Stibitz S. 1995. Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 177:2727-36.

243. Merkel T.J., Stübitz S., Keith J.M., Leef M., Shahin R. 1998. Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 66:4367-73.
244. Mesnard R., Guiso N., Michelet C., Sire J.M., Pouedras P., Donnio P.Y., Avril J.L. 1993. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12:304-306.
245. Meyer T.F. 1986. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: Evidence for gene conversion. *Cell* 44:107-115;
246. Middendorf B., Gross R. 1999. Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet.* 262:189-98.
247. Miller J.F., Johnson S.A., Black W.J., Beattie D.T., Mekalanos J.J., Falkow S. 1992. Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* gene. *J Bacteriol.* 174:970-9.
248. Mock M., Ullmann A. 1993. Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol.* 1:187-92.
249. Montaraz J.A., Novotny P., Ivanyi J. 1985. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 47:744-51.
250. Montoya M. 2003. Beta barrel membrane protein folding and structure of alpha hemolysin. *Bichim Biophys Acta.* 1609:19-27.
251. Mooi F.R., He Q., van Oirschot H., Mertsola J. 1999. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors *pertussis* toxin and *pertactin* in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun.* 67:3133-4.
252. Mooi F.R., Jansen W.H., Brunings H., Gielen H., van der Heide H.G., Walvoort H.C., Guinee P.A. 1992. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog.* 12:127-35.
253. Mooi F.R., van der Heide H.G., ter Avest A.R., Welinder K.G., Livey I., van der Zeijst B.A., Gaastra W. 1987. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog.* 2:473-84.
254. Mooi F.R., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H.G., Gaastra W., Willems R.J. 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors *P.69/pertactin* and *pertussis* toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun.* 66:670-5.
255. Moreno-López 1952 *Microbiol Esp* 5:177-181;
256. Moss J. 1994. Activation of cholera toxin by ADP-ribosylation factors. *Methods Enzymol.* 235-640-7.
257. Mouallem M. 1990. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 58, 3759-64.
258. Mountzouros K.T., Kimura A., Cowell J.L. 1992. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect Immun.* 60:5316-8.
259. Muller M., Hildebrandt A. 1993. Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. paraptussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.* 21:3320.
260. Musser J.M., Hewlett E.L., Peppler M.S., Selander R.K. 1986. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol.* 166:230-7.
261. Novotny P., Chubb A.P., Cownley K., Charles I.G. 1991. Biologic and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular *pertussis* vaccine. *J Infect Dis.* 164:114-22.
262. Novotny P., Chubb A.P., Cownley K., Montaraz J.A. 1985. Adenylate cyclase activity of a 68,000-molecular-weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 50:199-206.
263. O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA, Keusch GT. 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 180:65-94.
264. Oda T, Kojima Y, Akaike T, Ijiri S, Molla A, Maeda H. 1990. Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratial 56-kilodalton protease. *Infect Immun.* 1990 May;58(5):1269-72.
265. O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 2001 May;3(6):493-507.
266. Osborn M.J., Wu H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 34:369-422.
267. Oswald E., Sugai M., Labigne A., Wu H.C., Fiorentini C., Boquet P., O'Brien A.D. 1994. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3814-8.
268. Ota I.M., Varshavsky A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* 262:566-9.
269. Otero A.S., Yi X.B., Gray M.C., Szabo G., Hewlett E.L. 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem.* 270:9695-7.
270. Papini E., de Bernard M., Milia E., Bugnoli M., Zerial M., Rappuoli R., Montecucco C. 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9720-4.

271. Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., Holden M.T., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeno-Tarraga A.M., Temple L., James K., Harris B., Quail M.A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabinowitsch E., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B.G., Maskell D.J. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 35:32-40.
272. Parkinson J.S., Kofoed E.C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26:71-112.
273. Perron M.J., Blouse G.E., Shore J.D. 2003. Distortion of the catalytic domain of tissue-type plasminogen activator by plasminogen activator inhibitor-1 coincides with the formation of stable serpin-proteinase complexes. *J Biol Chem.* 278:48197-203.
274. Phillips A.D., Giron J., Hicks S., Dougan G., Frankel G. 2000. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology.* 146 (Pt 6):1333-44.
275. Pittman M. 1984. The concept of *pertussis* as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis.* 3:467-86.
276. Porter J.F., Wardlaw A.C. 1993. Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett.* 110:33-6.
277. Poulsen K., Brandt J., Hjorth J.P., Thøgersen H.C., Kilian M. 1989. Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect Immun.* 57:3097-105.
278. Prasad S.M., Yin Y., Rodzinski E., Tuomanen E.I., Masure H.R. 1993. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 61:2780-5.
279. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevens K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskell D.J. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-7.
280. Preston A., Maxim E., Toland E., Pishko E.J., Harvill E.T., Caroff M., Maskell D.J. 2003. *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol Microbiol.* 48:725-736.
281. Preston A., Thomas R., Maskell D.J. 2002. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *wlb* LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog.* 33:91-95.
282. Rabinovitch M., Veras P.S. 1996. Cohabitation of *Leishmania amazonensis* and *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 4:158-61.
283. Raetz C.R. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 59:129-70.
284. Raffel T.R., Register K.B., Temple L.M. 2000. Incidence of *Bordetella avium* in Wild Birds as Measured by Serology and Tracheal Cultures. 2000 American Society of Microbiology General Meeting.
285. Ray A., Redhead K., Seikirk S., Poole S. 1991. Variability in LPS composition, antigenicity and reactogenicity of phase variants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett* 79:211-218.
286. Register K.B., Ducey T.F., Brockmeier S.L., Dyer D.W. 2001. Reduced virulence of a *Bordetella bronchiseptica* siderophore mutant in neonatal swine. *Infect Immun.* 69:2137-43.
287. Regue M., Climent N., Abitiu N., Coderch N., Merino S., Izquierdo L., Altarriba M., Tomas J.M. 2001. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol.* 183:3564-73.
288. Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D.T., Saukkonen K., Wright S.D. 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (α M β 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 61:1375-82.
289. Relman D.A., Domenighini M., Tuomanen E., Rappuoli R., Falkow S. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2637-41.
290. Renauld-Mongenien G., Mielcarek N., Cornette J., Schacht A.M., Capron A., Riveau G., Locht C. 1996. Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:7944-9.
291. Riboli B., Pedroni P., Cuzzoni A., Grandi G., de Ferra F. 1991. Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (*fim*) genes in *Bordetella bronchiseptica*: *fimX* is expressed at a low level and vir-regulated. *Microb Pathog.* 10:393-403.
292. Rick P.D., Silver R.P. 1996. Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides. Cap. 9. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Segunda Edición. ASM Press. Washington DC.
293. Rivera M., McGroarty E.J. 1989. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 171:2244-8.

294. Roberts M., Fairweather N.F., Leininger E., Pickard D., Hewlett E.L., Robinson A., Hayward C., Dougan G., Charles I.G. 1991. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol.* 5:1393-404.
295. Rogel A., Hanski E. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem.* 267:22599-605.
296. Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270:26370-6.
297. Roy C.R., Falkow S. 1991. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the fhaB gene and autoregulation of the bvgAS operon. *J Bacteriol.* 173:2385-92.
298. Roy C.R., Miller J.F., Falkow S. 1990. Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* bvgABC operon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3763-7.
299. Rozengurt E., Higgins T., Chanter N., Lax A.J., Staddon J.M. 1990. *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:123-7.
300. Rudenko G., Cross M., Borst P. 1998. Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol.* 6:113-6.
301. Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
302. Russel M. 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol.* 279:485-99.
303. Sandkvist M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun.* 69:3523-35.
304. Sandkvist M., Bagdasarian M., Howard S.P., DiRita V.J. 1995. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* 14:1664-73.
305. Saukkonen K., Cabellos C., Burroughs M., Prasad S., Tuomanen E. 1991. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med.* 173:1143-9.
306. Scarlato V., Arico B., Prugnola A., Rappuoli R. 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 10:3971-5.
307. Scarlato V., Arico B., Rappuoli R. 1993. DNA topology affects transcriptional regulation of the pertussis toxin gene of *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli* and in vitro. *J Bacteriol.* 175:4764-71.
308. Scarlato V., Prugnola A., Arico B., Rappuoli R. 1990. Positive transcriptional feedback at the bvg locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:10067.
309. Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Laureto P., DasGupta B.R., Montecucco C. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature.* 359:832-5.
310. Schmidt G., Goehring U.M., Schirmer J., Lerm M., Aktories K. 1999. Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem.* 274:31875-81.
311. Schmidt G., Goehring U.M., Schirmer J., Uttenweiler-Joseph S., Wilm M., Lohmann M., Giese A., Schmalzing G., Aktories K. 2001. Lysine and polyamines are substrates for transglutamination of Rho by the *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 69:7663-70.
312. Schnaitman C.A., Klena J.D. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev.* 57:655-82.
313. Schneider B., Gross R., Haas A. 2000. Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun.* 68:7039-48.
314. Shahin R.D., Witvliet M.H., Manclark C.R. 1990. Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect Immun.* 58:4063-8.
315. Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *Nature.* 407:81-6.
316. Sinai A.P., Joiner K.A. 1997. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol.* 51:415-62.
317. Sinha R.K., Rosenthal R.S. 1980. Release of soluble peptidoglycan from growing conococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments. *Infect Immun.* 29:914-25.
318. Smith G.A., Portnoy D.A. 1997. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. *Trends Microbiol.* 5:272-6.
319. Spangrude G.J., Sacchi F., Hill H.R., Van Epps D.E., Daynes R.A. 1985. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol.* 135:4135-43.
320. Steed L.L., Setareh M., Friedman R.L. 1991. Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 50:321-30.
321. Steffen P., Goyard S., Ullmann A. 1996. Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 15:102-9.

322. Stenson T.H., Patton A.K., Weiss A.A. 2003. Reduced glutathione is required for *pertussis* toxin secretion by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 71:1316-20.
323. Stibitz S., Aaronson W., Monack D., Falkow S. 1989. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature.* 338:266-9.
324. Stibitz S., Yang M.S. 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 173:4288-96.
325. Stibitz S., Yang M.S. 1997. Genomic fluidity of *Bordetella pertussis* assessed by a new method for chromosomal mapping. *J Bacteriol.* 179:5820-6.
326. Stockbauer K.E., Foreman-Wykert A.K., Miller J.F. 2003. *Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cell Microbiol.* 5:123-32.
327. Stockbauer K.E., Fuchslocher B., Miller J.F., Cotter P.A. 2001. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 39:65-78.
328. Suzuki T., Lett M.C., Sasakawa C. 1995. Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem.* 270:30874-80.
329. Sweet C.R., Preston A., Toland E., Ramirez S.M., Cotter R.J., Maskell D.J., Raetz C.R. 2002. Relaxed acyl chain specificity of *Bordetella* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferases. *J Biol Chem.* 277:18281-90.
330. Tamura M., Nogimori K., Murai S., Yajima M., Ito K., Katada T., Ui M., Ishii S. 1982. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 21:5516-22.
331. Tang Y.W., Hopkins M.K., Kolbert C.P., Hartley P.A., Severance P.J., Persing D.H. 1998. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis.* 26:389-92.
332. Tilney L.G., Portnoy D.A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 109:1597-608.
333. Torre D., Pugliese A., Speranza F., Fiori G.P., Perversi L., Marone P., Tambini R. 1993. Interferon-gamma levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 167:762-5.
334. Torres A.G., Redford P., Welch R.A., Payne S.M. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun.* 69:6179-85.
335. Tuomanen E., Weiss A. 1985. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 152:118-25.
336. Turcotte M.L., Martin D., Brodeur B.R., Peppler M.S. 1997. Tn5-induced lipopolysaccharide mutations in *Bordetella pertussis* that affect outer membrane function. *Microbiology.* 143:2381-94.
337. Uhl M.A., Miller J.F. 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1163-7.
338. Uhl M.A., Miller J.F. 1996. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem.* 271:33176-80.
339. Uhl M.A., Miller J.F. 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15:1028-36.
340. Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 16:379-414.
341. van den Akker W. 1998. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiol.* 144:1527-1535.
342. van den Akker W.M. 1997. *Bordetella bronchiseptica* has a BvgAS-controlled cytotoxic effect upon interaction with epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 156:239-44.
343. van den Berg B.M., Beekhuizen H., Willems R.J., Mooi F.R., van Furth R. 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun.* 67:1056-1062.
344. Vandamme P., Heyndrickx M., Vancanneyt M., Hoste B., De Vos P., Falsen E., Kersters K., Hinz K.H. 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 46:849-58.
345. Vandamme P., Hommez J., Vancanneyt M., Monsieus M., Hoste B., Cookson B., Wirsing von Konig C.H., Kersters K., Blackall P.J. 1995. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol.* 45:37-45.
346. van't Wout J., Burnette W.N., Mar V.L., Rozdzinski E., Wright S.D., Tuomanen E.I. 1992. Role of carbohydrate recognition domains of *pertussis* toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun.* 60:3303-8.
347. Vinogradov E. 2000. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharides from *Bordetella hinzii* and *Bordetella bronchiseptica*. *Eur J Biochem.* 267:4577-82.
348. von Wintzingerode F., Gerlach G., Schneider B., Gross. 2002. Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 264:177-99.

349. Walker K.E., Weiss A.A. 1994. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun.* 62:3817-28.
350. Wallis T.S., Galyov E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 36(5):997-1005.
351. Weiss A.A., Falkow S. 1984. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 43:263-9.
352. Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 150:219-22.
353. Weiss A.A., Johnson F.D., Burns D.L. 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2970-4.
354. Weiss A.A., Melton A.R., Walker K.E., Andraos-Selim C., Meidl J.J. 1989. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun.* 57:2674-82.
355. West N.P., Jungnitz H., Fitter J.T., McArthur J.D., Guzman C.A., Walker M.J. 2000. Role of phosphoglucosyltransferase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun.* 68:4673-80.
356. Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Amlin M.F., Steigerwalt A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W., Brenner D.J. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 33:1-7.
357. Whitfield C. 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* 3:178-85.
358. Willems R., Paul A., van der Heide H.G., ter Avest A.R., Mooi F.R. 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J.* 9:2803-9.
359. Willems R.J., van der Heide H.G., Mooi F.R. 1992. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol.* 6:2661-71.
360. Winkler H.H. 1990. *Rickettsia* species (as organisms). *Annu Rev Microbiol.* 44:131-53.
361. Winstanley C., Hales B.A., Hart C.A. 1999. Evidence for the presence in *Burkholderia pseudomallei* of a type III secretion system-associated gene cluster. *J Med Microbiol.* 48:649-56.
362. Wirth H.P., Yang M., Peek R., Tham K. T., Blaser. M. J. 1997. *H. pylori* Lewis expression is related to the host phenotype. *Gastroenterology.* 113:1091-1098.
363. Woolfrey B.F., Moody J.A. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 4:243-55.
364. Yabuuchi E., Kawamura Y., Kosako Y., Ezaki T. 1998. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 42:429-38.
365. Yih W.K., Silva E.A., Ida J., Harrington N., Lett S.M., George H. 1999. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis.* 5:441-3.
366. Yuk M.H., Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 35:991-1004.
367. Yuk M.H., Harvill E.T., Miller J.F. 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 28:945-59.
368. Yuk M.H., Heininger U., Martinez de Tejada G., Miller J.F. 1998. Human but not ovine isolates of *Bordetella parapertussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection.* 26:270-3.
369. Zu T., Manetti R., Rappuoli R., Scarlato V. 1996. Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 21:557-65.

CAPÍTULO II

Análisis de la variación estructural del lipopolisacárido de *Bordetella bronchiseptica* frente a señales sensadas por el sistema de transducción de dos componentes BvgAS.

INTRODUCCIÓN

Como hemos detallado en la introducción de este trabajo de tesis, *B. bronchiseptica* ha sido descrita no sólo como patógeno de animales domésticos y de granja sino además como agente causal de infecciones respiratorias en humanos (2, 5, 6, 31, 48, 49). A diferencia del patógeno humano *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* presenta además de un período agudo cuya sintomatología depende del hospedador (Ej: rinitis atrófica en cerdos o tos perruna en perros), un período crónico asintomático que constituye uno de los principales focos de contagio. De ambos períodos, el agudo ha sido el más estudiado, identificándose incluso los factores bacterianos que son esenciales para la colonización, multiplicación y evasión de la defensa montada por el hospedador (13, 16, 17, 25, 46). Este grado de conocimiento no fue alcanzado hasta el momento sobre la etapa de cronicidad, sin embargo esta etapa resulta de particular interés ya que es en donde la bacteria puede diseminarse silenciosamente dentro de la población susceptible. Sólo se ha descrito que para desencadenar un proceso crónico, las bacterias deben sufrir cambios fenotípicos (18, 19). Estos cambios que consisten, según lo informado por Gueirard y colaboradores (1995) (19), en la pérdida paulatina de las adhesinas y toxinas características de la fase denominada virulenta se van sucediendo desde el inicio de la infección hasta tiempo después de que los síntomas de la enfermedad han desaparecido. Es decir que en estadios tempranos las bacterias expresan todo los factores necesarios para iniciar la infección y luego en período crónico dejan de expresarlos para transformarse en una bacteria con características propias de la fase avirulenta. Los primeros factores que dejan de expresarse durante el proceso infeccioso son las adhesinas FHA y PRN. Luego en las últimas etapas de la infección lo hacen las toxinas y más específicamente la adenilato ciclasa - hemolisina. Estos cambios en la expresión de estos diferentes factores proteicos son acompañados con una variación en la estructura del lipopolisacárido (LPS) (18). Esta variación no es menor ya que se encuentra involucrada una porción importante correspondiente a la parte distal del LPS.

Todos estos cambios fenotípicos observados a lo largo del proceso infeccioso de *B. bronchiseptica* podrían corresponderse, al igual que ocurre en otros procesos infectivos causados por otros patógenos, con una estrategia desarrollada por esta bacteria para persistir por largos períodos dentro del hospedador (50). De ser así, el fenotipo observado durante el período crónico de la infección causada por *B. bronchiseptica* sería consecuencia de un proceso de adaptación/selección a los diferentes nichos que el patógeno va encontrando dentro del hospedador durante el ciclo infeccioso.

La particularidad de que la disminución en la expresión de los diferentes factores de virulencia observada *in vivo* sea progresiva resulta coincidente con la del fenómeno de modulación fenotípica mediado por el sistema de dos componentes BvgAS (11, 26, 27, 51). Como hemos descrito en la introducción de este trabajo de tesis, a través de BvgAS *B. bronchiseptica* es capaz de alternar entre dos fases, virulenta y avirulenta. Esta alternancia

ocurre de manera secuencial y el patrón de expresión de los diferentes factores resulta de una regulación diferencial ejercida por BvgA. El establecimiento de un paralelismo entre la variación fenotípica observada *in vivo* y el fenómeno de modulación sin embargo se ve dificultado porque aún no se ha esclarecido completamente la relación entre BvgAS y el componente superficial LPS, que también varía *in vivo*. Se ha estudiado sólo la acción de algunos agentes moduladores de la actividad del sistema BvgAS sobre la estructura del LPS. Por ejemplo se ha estudiado el efecto de las bajas temperaturas (34, 45) observándose variaciones en la estructura del LPS que parecen depender de la cepa bacteriana pero independiente del origen del aislamiento (45). Sin embargo de dicho trabajo no se deduce fácilmente si las variaciones observadas ocurren a través del sistema de dos componentes. Otro de los moduladores estudiados es la presencia de iones sulfato, en este caso se pudo observar un aumento en la proporción de LPS conteniendo antígeno O junto a la desaparición de un doblete de la banda A, característica de la cepa en estudio (34). Esta modificación parece estar mediada por BvgAS ya que cepas con el sistema de dos componentes bloqueado (ya sea siempre activo o siempre inactivo) no responden a la presencia de iones sulfato. A nivel molecular se ha identificado al gen *pagP* que codifica para una enzima responsable de la palmitoilación del lípido A del LPS (7, 20) como un gen regulado por el sistema de dos componentes (34). Se ha observado que una delección en dicho gen genera en ausencia de sulfato un perfil de LPS que es indistinguible de la cepa parental en condiciones de avirulencia. Sin embargo, en presencia de iones sulfato dicho mutante defectivo también presenta modificaciones adicionales en la estructura del LPS que no ha sido posible explicar hasta el momento. Nuevos experimentos se deberán realizar para determinar claramente el efecto de éste y otros moduladores conocidos sobre el LPS e incluso para verificar si dichos moduladores actuarían a través de BvgAS o a través de la activación de otros mecanismos independientes de BvgAS pero que producirían el mismo efecto.

Con el fin de avanzar en el conocimiento sobre la relación del sistema de dos componentes BvgAS y el LPS y de establecer a partir del mismo las bases para considerar a la modulación fenotípica como un proceso que también ocurre *in vivo*, en esta etapa del trabajo de Tesis analizamos a través de corridas electroforéticas el efecto de la presencia de los moduladores conocidos del sistema BvgAS sobre la estructura del LPS. Trabajamos tanto con aislamientos de *B. bronchiseptica* provenientes de diferentes hospedadores como con cepas que varían entre sí solo en la funcionalidad del sistema BvgAS.

Los materiales y métodos empleados como así también los resultados obtenidos se describen a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla II.1.

Tabla II.1: Descripción de los aislamientos y cepas de *B. bronchiseptica* utilizados en este trabajo.

Cepa o aislamiento	Descripción	Referencia
<i>B. bronchiseptica</i> R1 (BbR1)	Aislamiento de <i>B. bronchiseptica</i> obtenido de una paciente durante un episodio de infección aguda. LPS liso. BvgAS ⁺ . AC-Hly ⁺ , PRN ⁺ , FHA ⁺ . Sm ^r	18
<i>B. bronchiseptica</i> R4 (BbR4)	Aislamiento de <i>B. bronchiseptica</i> obtenido de una paciente durante un episodio de infección crónico. LPS rugoso profundo. BvgAS ⁺ . AC-Hly ⁻ , PRN ⁻ , FHA ⁻ . Sm ^r	18
<i>B. bronchiseptica</i> 9.73 (Bb9.73)	Cepa obtenida de un conejo. LPS liso. BvgAS ⁺ . AC-Hly ⁺ . PRN ⁺ . FHA ⁺ . Sm ^r	29
<i>B. bronchiseptica</i> bvgA ⁻ (BbbvgA ⁻)	Cepa mutante defectiva en la expresión de <i>bvgA</i> obtenida a partir de Bb 9.73 por mutagénesis insercional sitio específica. LPS liso. No hemolítica. Sm ^r . Km ^r	Nuestro laboratorio. Tesis Doctoral Bioq. Julieta Fernández (en preparación)

La construcción del mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión de *bvgA* fue realizado por la Bioquímica Julieta Fernández de nuestro laboratorio durante su trabajo de tesis doctoral (tesis en redacción). El mismo fue obtenido mediante mutagénesis insercional sitio específica. Si bien los detalles de la construcción se describirán en el Trabajo de Tesis de la Bioquímica, para una comprensión de los pasos generales que se siguen durante este tipo de mutagénesis se recomienda leer la sección de materiales y métodos del siguiente capítulo ya que allí encontrarán la aplicación de esta metodología en la construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del LPS.

En todos los casos, las suspensiones bacterianas se conservaron como liofilizados y/o a -20 °C y -80 °C en presencia de glicerol 50% y 25% v/v, respectivamente. Los liofilizados bacterianos se resuspendieron en una solución de casaminoácidos al 1% p/v y se plaquearon en el medio sintético de Stainer–Scholte (SS) (40) sólido suplementado con 15% de sangre desfibrinada de caballo (SSs). La composición del medio SS se describe en el apéndice de esta tesis (pág. 186). Las bacterias se cultivaron durante 48 horas y luego se subcultivaron por 24 hrs. en placas SSs a 37 °C. A fin de inducir la modulación de fase, el

crecimiento de estas placas se transfirió a otras placas que contenían al medio SSs suplementado con agentes moduladores de fase como se indica a continuación.

2. Cultivo de microorganismos en presencia de agentes moduladores de fase

Las bacterias cultivadas en medio sólido SSs durante 48 horas a 37° C se repicaron en presencia de los siguientes agentes moduladores:

- baja temperatura (22 °C).
- presencia de MgSO₄ en una concentración final de 40 mM, a 37° C.
- presencia de ácido nicotínico en una concentración final de 10 mM, a 37° C.

En todos los casos se realizaron sucesivos repiques, seleccionando cada vez aquellas colonias que presentaban las características morfológicas correspondientes a la fase avirulenta, es decir desaparición del halo de hemólisis y presencia de movilidad. Para ello se plaquearon diluciones adecuadas de una suspensión bacteriana en placas conteniendo SSs y transcurridas 16 horas se observó si las colonias presentaban halo de hemólisis. Aquellas colonias sin actividad hemolítica fueron seleccionadas a fin de evaluar si presentaban movilidad en el medio SS suplementado con agar 0,35% p/v. Transcurridas 18 horas se observó la movilidad como una opalescencia leve alrededor del punto de siembra. Aquellas colonias que no presentaron halo de hemólisis en placas SSs y eran móviles en las condiciones descriptas, fueron seleccionadas para ser utilizadas en los posteriores ensayos.

3. Aislamiento del lipopolisacárido de *Bordetella* y análisis en geles de SDS-PAGE

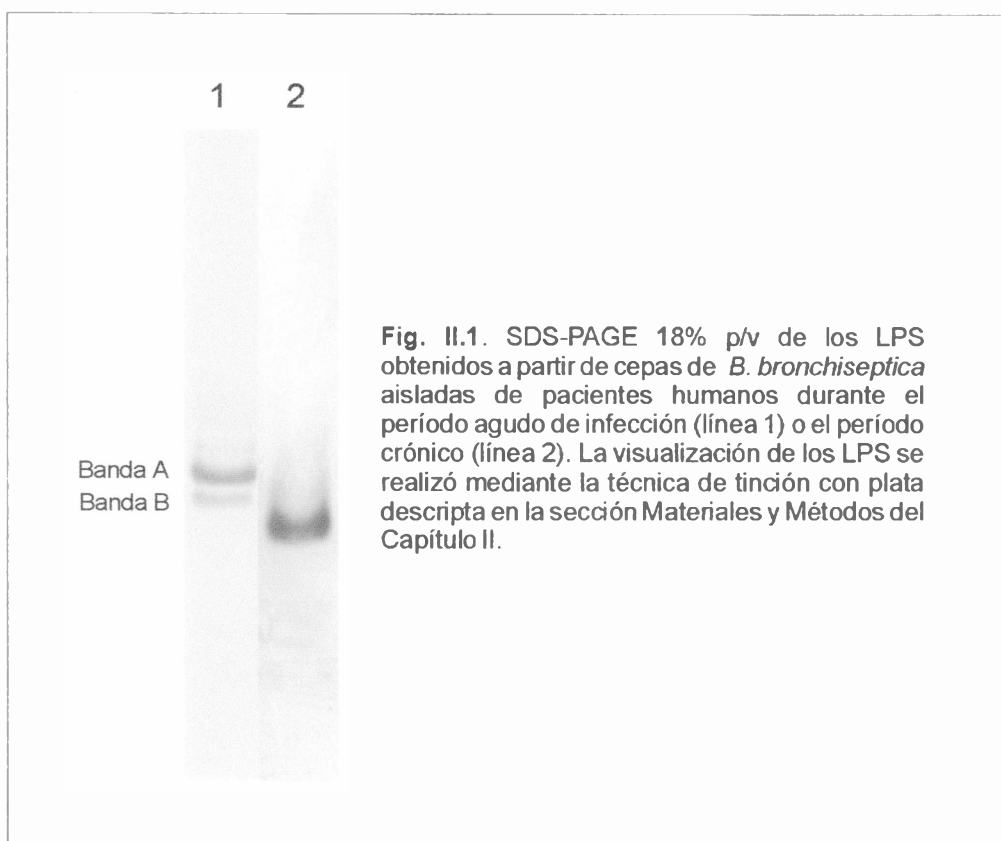
Los lipopolisacáridos de las bacterias crecidas en las diferentes condiciones fueron purificados por la técnica descrita por Valverde y col. (1997) (Nuestro laboratorio, 43). Brevemente, aproximadamente 20 mg de bacterias (peso húmedo) provenientes de medio sólido se resuspendieron en 100 µl de solución de EDTA - Trietilamina 100 mM pH 7,0. La suspensión se incubó con agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 2 minutos a 10000 X g y el sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se le agregaron 50 µl de una resina con polimixina B suspendida en 1,0 mM EDTA, 0,1 mM HEPES, pH 7,5 y 0,05 % azida de sodio (Affi-Prep Polymyxin®, Bio-Rad). La mezcla se incubó durante 15 minutos con agitación suave y luego se centrifugó durante 2 minutos a 10000 X g. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de KH₂PO₄ 100 mM y NaCl 150 mM pH 7,0, se mezcló y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de buffer de Laemmli 1X (ver composición en apéndice) y 4 µl de β-mercaptoetanol. En ocasiones se incubaron las muestras con pronasa (2 mg ml⁻¹) durante toda la noche a 37° C. Las muestras fueron calentadas en agua hirviendo durante 10 minutos y luego sonicadas durante 15 minutos. Las muestras así obtenidas se sembraron en geles de poliacrilamida 18% p/v con SDS. La composición de las distintas soluciones utilizadas para la preparación de los geles se detalla en el Apéndice de este trabajo (pág. 185). Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (120 volts) durante 2 horas y luego a

corriente constante de 20 mA durante 5 horas. Una vez finalizada la corrida, los LPS se visualizaron mediante una tinción de plata según se describe a continuación. Luego de fijar el gel durante al menos 2 horas en solución de ácido acético 5% v/v en etanol 40% v/v, el mismo se incubó en solución de ácido periódico 0,7% p/v durante 10 minutos con el fin de oxidar a los grupos OH^- adyacentes que se encuentran en los azúcares del LPS presente en el gel. Luego se realizaron 5 lavados con agua bidestilada de 5 minutos cada uno para retirar el oxidante excedente. Posteriormente se realizó la coloración con una solución de plata al 10% v/v de Bio-Rad. Transcurridos 10 minutos se lavó seis veces con agua bidestilada cinco segundos en cada lavado y se procedió al agregado del desarrollador también de Bio-Rad (3 g en 200 ml de agua bidestilada). El gel se incubó con dicha solución hasta aparición de color en las bandas correspondientes a los LPS presentes. La reacción se detiene con ácido acético 5% v/v. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación blanca.

RESULTADOS

Descripción del perfil electroforético de los LPS obtenidos de los aislamientos provenientes de diferentes periodos de infecciones de *B. bronchiseptica* en humanos

El LPS de las bacterias aisladas en las primeras etapas de la infección, *B. bronchiseptica* R1 (*BbR1*), presentan un perfil electroforético compuesto por dos bandas denominadas A y B características del género *Bordetella* (9,33). La banda de mayor movilidad corresponde al lípido A junto al core del LPS y la restante corresponde a la estructura anterior más el trisacárido característico de la especie (Fig. II.1).



Como puede observarse en dicha figura el antígeno O en este aislamiento no pudo ser detectado mediante la tinción con plata. Sin embargo, según se informó en el trabajo de Le Blay y colaboradores el mismo estaría presente pero en cantidades que sólo pueden visualizarse mediante técnicas más sensibles que emplean anticuerpos específicos para esta estructura (29).

El LPS presente en la bacteria aislada durante el periodo crónico de infección (*BbR4*), muestra un perfil electroforético compuesto sólo por una banda que es de mayor movilidad respecto de las correspondientes a la bacteria *BbR1* (Fig. II.1). Este fenotipo ha sido descrito en Enterobacterias como fenotipo *deep rough* o rugoso profundo (54).

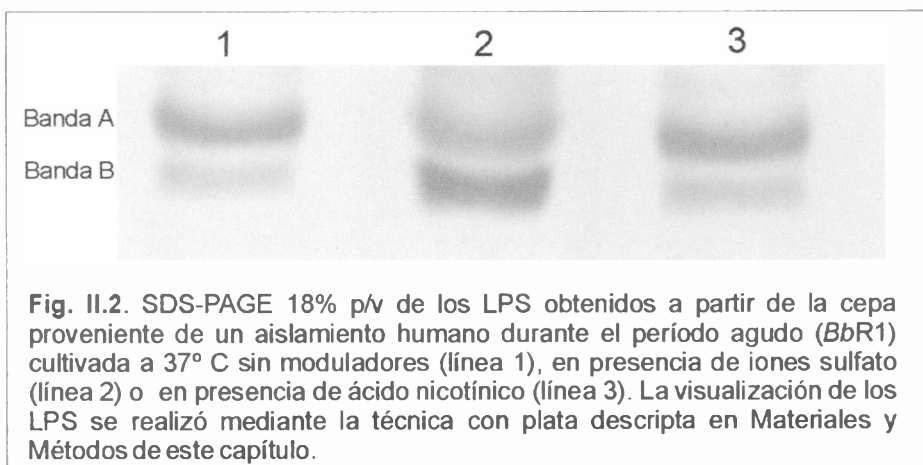
Efecto de los agentes moduladores sobre aislamientos de origen humano obtenidos en diferentes periodos de la infección

Modulación de los diferentes aislamientos de *B. bronchiseptica*

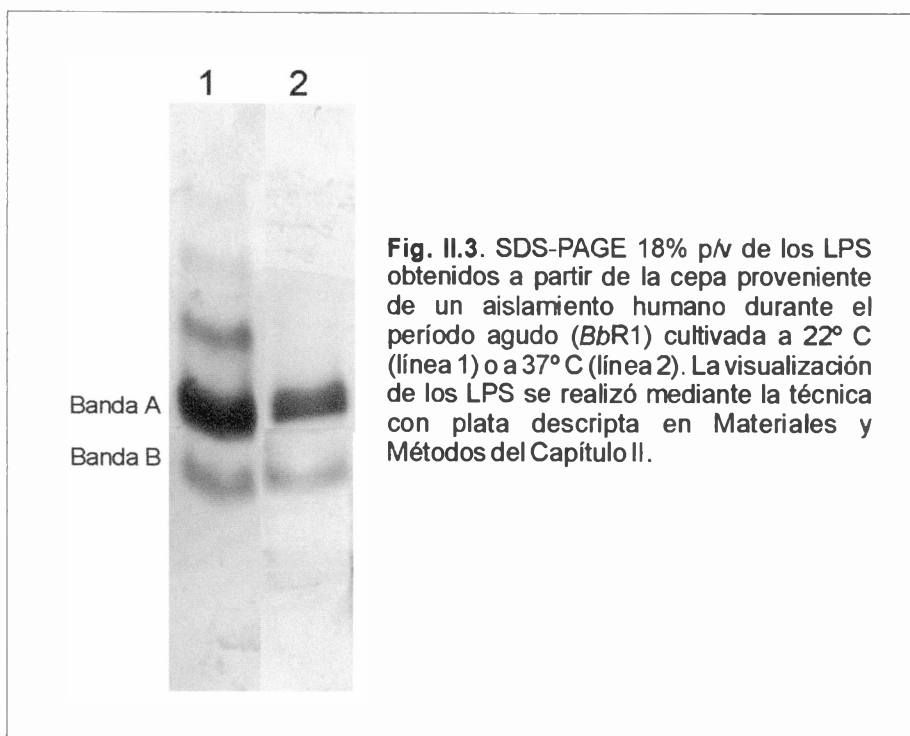
La modulación fenotípica de las diferentes bacterias utilizadas en este trabajo se realizó empleando medios sólidos suplementados con los diferentes agentes moduladores es decir, iones sulfato o ácido nicotínico o cultivando las bacterias a temperaturas menores a 25° C. En todo los casos se realizó el mismo procedimiento que se describe a continuación: las bacterias fueron repicadas sucesivas veces en presencia de lo moduladores hasta observar la desaparición de marcadores de virulencia (halo de hemólisis) y aparición de marcadores de avirulencia (ej. flagelo, movilidad). Sobre aquellas colonias que presentaban el fenotipo buscado, es decir colonias móviles no hemolíticas, se procedió al aislamiento del LPS y a su caracterización estructural mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida.

Aislamiento *BbR1* proveniente del período agudo de la infección

Efecto de los iones sulfato y del ácido nicotínico: En presencia de iones sulfato es posible observar un aumento en la cantidad relativa de la banda B correspondiente al lípidoA-core-trisacárido de los LPS extraídos de bacterias del aislamiento *BbR1* (Fig. II.2). En cambio en presencia de ácido nicotínico dicha diferencia no puede ser observada. Esto no se observa en el LPS extraído de *BbR1* en ausencia de moduladores, en esta condición claramente la banda A es la más intensa.



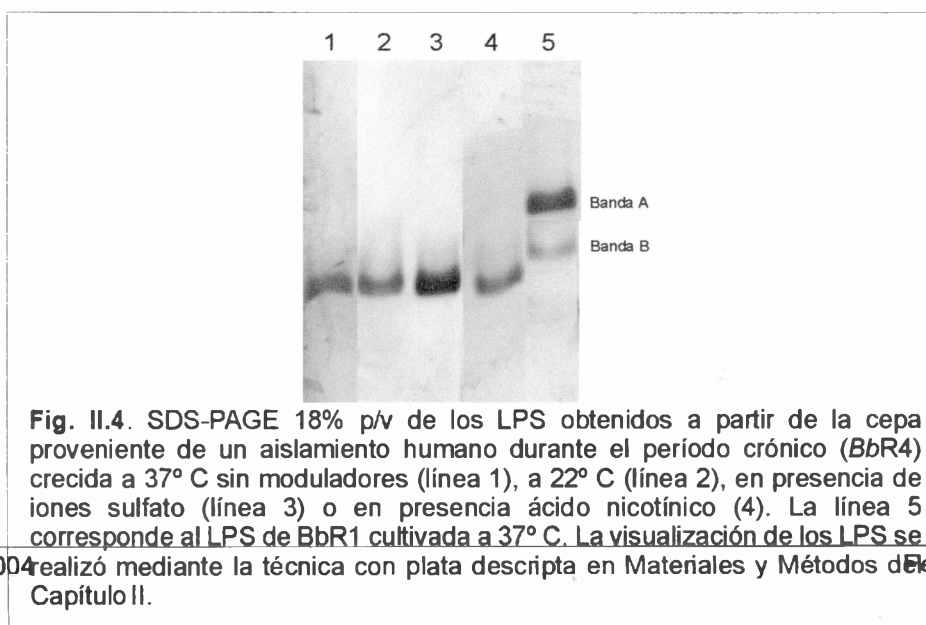
Efecto del cultivo a 22° C: Como puede observarse en la Figura II.3, la disminución de la temperatura de cultivo hasta 22°C indujo cambios cualitativos sobre la estructura del LPS de *BbR1* en la estructura del LPS.



A 22 °C puede observarse la aparición de bandas de menor movilidad sin que se modifiquen las cantidades relativas de las bandas A y B.

Aislamiento *BbR4* proveniente del período crónico de la infección

Efecto de los iones sulfato, del ácido nicotínico y del cultivo a 22 °C: Estos moduladores se ensayaron de igual manera que para *BbR1* sobre el aislamiento proveniente del período crónico *BbR4* y en ningún caso se observó modificación apreciable en el perfil del LPS respecto al obtenido en ausencia de los mismos (Fig. II.4).



Descripción del perfil electroforético del LPS de un aislamiento de origen animal (*Bb9.73*)

Con el fin de observar el efecto de los moduladores sobre *Bb9.73* esta cepa fue cultivada en las mismas condiciones que las descritas anteriormente para los aislamientos de origen humano. El perfil electroforético presente en la cepa *Bb9.73* se caracteriza por la presencia de tres bandas (Fig. II.5): las bandas A y B compuestas por las estructuras lípido A-core-trisacárido y lípido A-core, respectivamente, junto a una banda difusa de menor movilidad correspondiente a lípido A-core-trisacárido-antígeno O. La proporción de LPS con antígeno O en *Bb9.73* es mayoritaria respecto al resto de las formas.

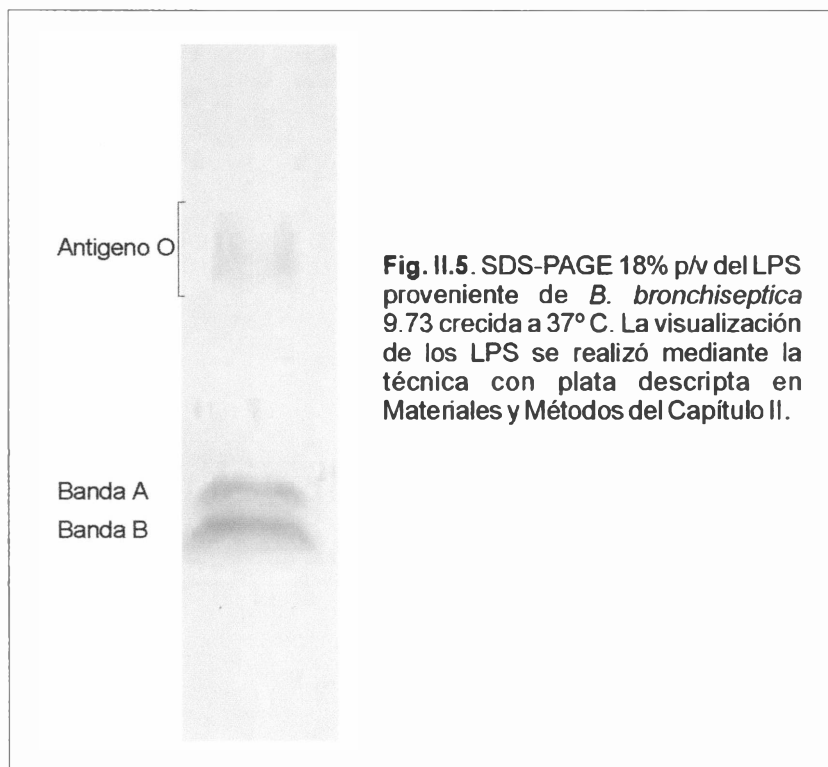


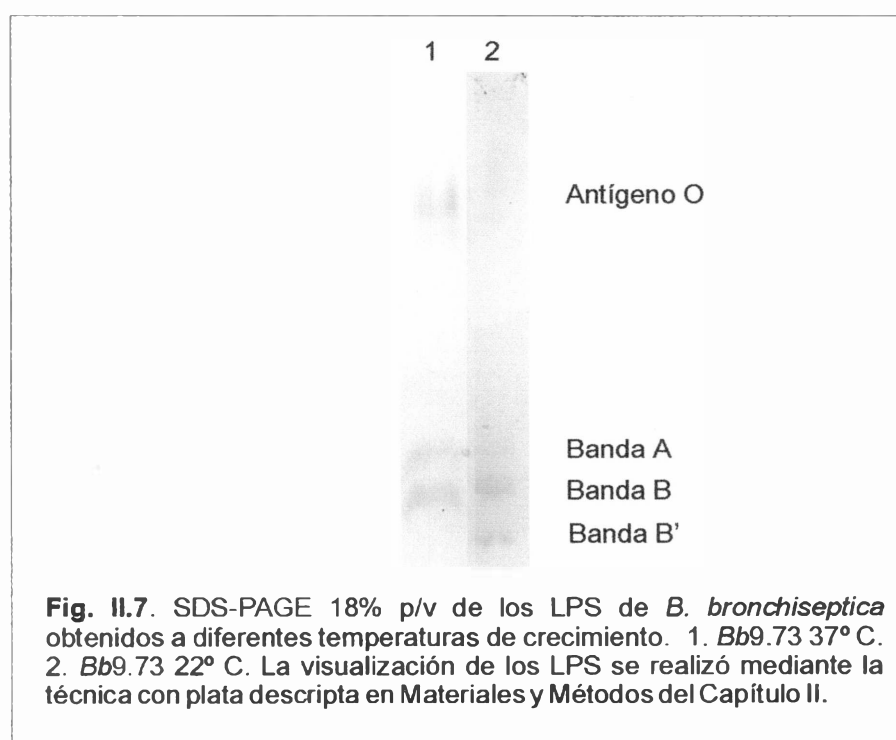
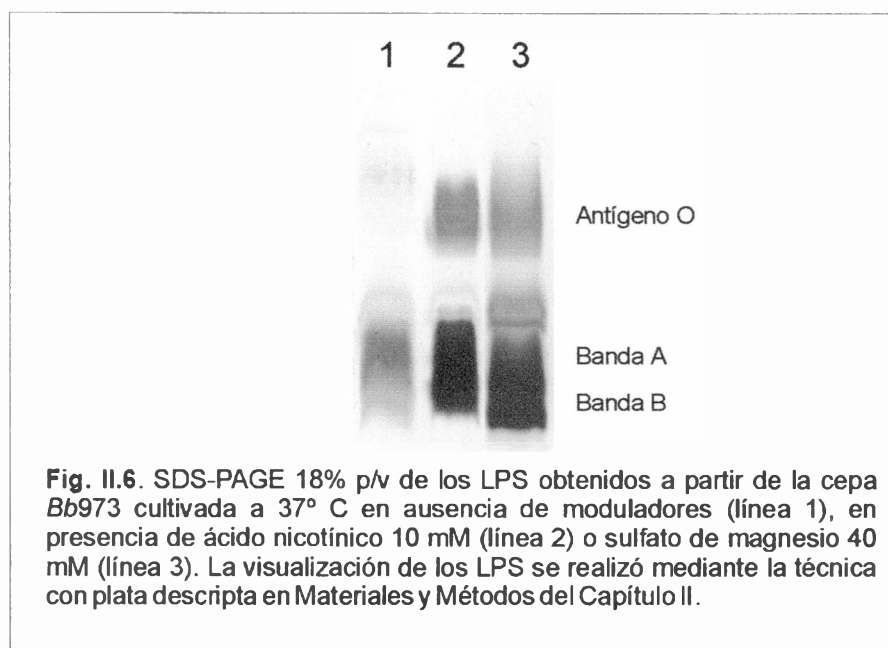
Fig. II.5. SDS-PAGE 18% p/v del LPS proveniente de *B. bronchiseptica* 9.73 crecida a 37° C. La visualización de los LPS se realizó mediante la técnica con plata descrita en Materiales y Métodos del Capítulo II.

Efecto de los agentes moduladores sobre aislamientos de origen animal

Efecto de la presencia de iones sulfato y del ácido nicotínico: El perfil electroforético del LPS de la cepa *Bb9.73* se ve alterado sólo de manera cuantitativa tanto en presencia de iones sulfato como de ácido nicotínico (Fig. II.6). En presencia de cualquiera de ellos, *Bb9.73* posee un LPS con las tres bandas características, con diferencias en las cantidades relativas respecto al LPS presente en ausencia de cada modificador.

Como se observa en la figura II.6, en presencia de los moduladores la cantidad extraída de LPS se ve incrementada a pesar de haber partido de igual cantidad de biomasa para todas las muestras (20 mg de peso húmedo). También se puede observar que en presencia

de sulfato o ácido nicotínico hay un aumento de la movilidad electroforética del antígeno O, quizás como consecuencia de una disminución de su tamaño.



Efecto del cultivo a 22° C: La acción moduladora sobre el LPS de *Bb9.73* del otro agente es decir el cultivo bacteriano a bajas temperaturas, no induce los cambios observados en

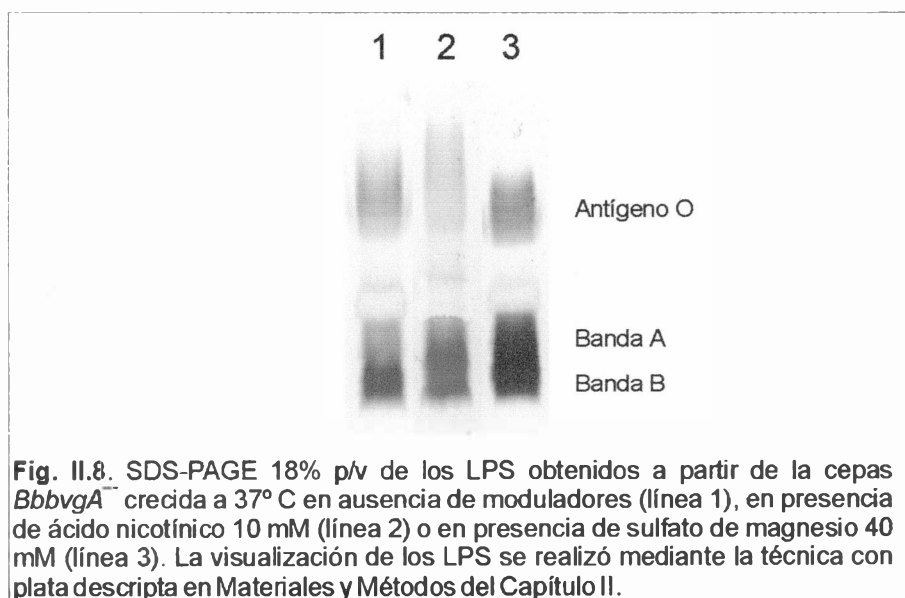
presencia de iones sulfato o ácido nicotínico. Por el contrario, la cantidad de antígeno O se ve disminuida durante el crecimiento a 22° C. Sin embargo, el cambio más significativo observado en esta condición es la aparición de una banda adicional de mayor movilidad electroforética (Fig. II.7). Ninguno de los otros dos moduladores indujeron la presencia de esta banda ni para las bacterias de origen humano ni para la cepa *Bb9.73*.

Con el fin de descartar que la presencia de la banda adicional se debieran a una mutación seleccionada durante los repiques la cepa *Bb9.73* crecida a 22°C fue nuevamente cultivada a 37° C. Una vez que la bacteria cambió de fase y recuperó su actividad hemolítica, se analizó el perfil electroforético de su LPS (Fig. II.8). En esta condición el LPS volvió a presentar el perfil electroforético correspondiente a una bacteria en fase virulenta.

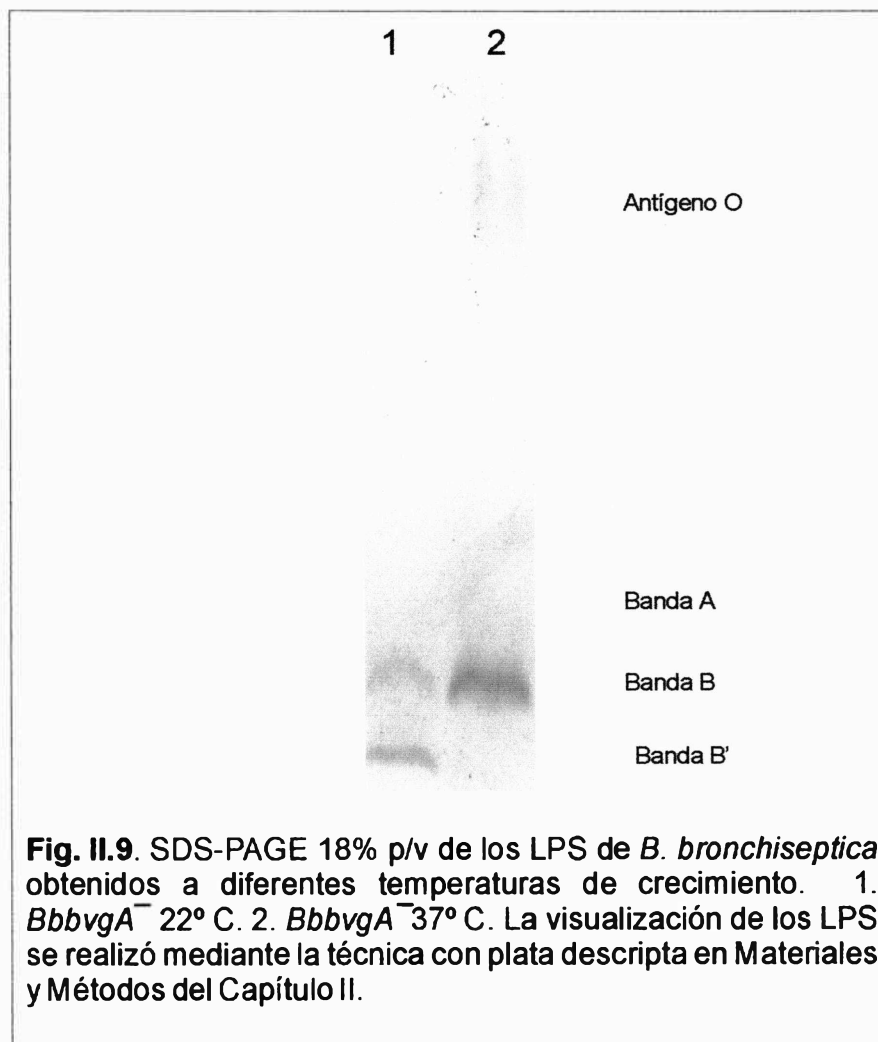
Efecto de los agentes moduladores sobre *BbbvgA*⁻

Para analizar si las modificaciones observadas se producen a través a la acción del sistema sensor BvgAS se trabajó con un mutante de *Bb9.73* defectivo en la expresión del gen *bvgA* (*BbbvgA*⁻). Este mutante con el sistema de traducción de señales bloqueado se encuentra en fase avirulenta. La interrupción del gen *bvgA* en *Bb9.73* produjo las modificaciones en el perfil electroforético del LPS ya descritas por otros autores para la fase avirulenta. Es así que en el perfil del LPS de este mutante es posible observar un aumento de intensidad de la banda correspondiente al LPS que contiene antígeno O respecto a las bandas restantes y un leve aumento de su movilidad respecto a la presente en el LPS de la cepa parental. Este mismo efecto es el que se observa en la cepa parental en presencia de iones sulfato o ácido nicotínico (Fig. II.6).

Efecto de la presencia de iones sulfato y ácido nicotínico. La cepa *bvgA*⁻ no presenta modificaciones en su LPS al crecer en presencia de los moduladores respecto al observado en ausencia de los mismos (Fig. II.8).



Efecto del cultivo a 22° C. La acción moduladora del otro agente es decir el cultivo a bajas temperaturas resultó ser similar al observado en la cepa *Bb9.73* conteniendo el sistema BvgAS intacto (Fig. II.9). Es decir que con el mutante a bajas temperaturas también se pudo observar la aparición de una banda adicional de mayor movilidad. Este resultado indicaría que el cambio observado en esta condición es independiente de la funcionalidad del sistema de dos componentes .



DISCUSIÓN

Numerosas bacterias y organismos patogénicos de otra naturaleza son capaces de persistir dentro del hospedador durante largos períodos de manera asintomática produciendo una infección persistente o crónica (ej. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* y *Streptococcus pyogenes*) (14,15,23,28,32,39,42,44). Este fenómeno de persistencia se produce aún en hospedadores inmunocompetentes a pesar de la respuesta inmune que ellos desarrollan. Esta respuesta en general, está dirigida a los factores de virulencia de superficie o secretados por el patógeno y es por ello que la variación estructural o de la síntesis de estos componentes durante el transcurso de la infección se constituye en uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune más difundido entre los patógenos. La infección causada por *B. bronchiseptica* que lleva a periodos de cronicidad parece no ser la excepción a dichos mecanismos de evasión ya que se ha observado que el patrón de expresión de algunos factores varía a lo largo de la infección (18,19). La cinética del cambio de expresión observado *in vivo* para *B. bronchiseptica* parece coincidir con el correspondiente al fenómeno de modulación de fases mediado por el sistema de transducción de señales BvgAS. Sin embargo, la falta de un conocimiento acabado sobre la relación entre uno de los componentes de superficie que varía *in vivo* y el sistema BvgAS dificulta el establecimiento de un paralelismo entre el fenómeno observado *in vivo* y la modulación fenotípica. Es por ello que en esta etapa nos propusimos profundizar el conocimiento de la relación entre el funcionamiento del sistema BvgAS y la variación estructural del LPS. En primer lugar analizamos el efecto de los tres agentes moduladores de la actividad del sistema BvgAS conocidos hasta el momento, iones sulfato, ácido nicotínico y bajas temperaturas de cultivo, sobre el LPS proveniente de un aislamiento humano obtenido durante la fase aguda de la infección (*BbR1*). La elección de este aislamiento se basó en la capacidad que parece poseer el mismo de modificar su LPS hacia la forma trunca característica del período crónico de infección. Los resultados obtenidos muestran que los cambios en las estructuras del LPS de *BbR1* son dependientes del tipo de modulador empleado. Por un lado, tanto la presencia de iones sulfato como de ácido nicotínico inducen un aumento en la cantidad relativa de la banda B, que representa la estructura de un LPS compuesto por el lípido A-core (Fig. II.2). Esto podría indicar que la presencia de estos moduladores actuaría disminuyendo la eficiencia de adición del trisacárido al core. Más aún, podría suponerse que los moduladores a través del sistema BvgAS afectan la expresión de los genes *wlb* involucrados justamente en el proceso de sustitución del trisacárido (1,35). Corroborando esta suposición, se ha observado que en presencia de sulfato o ácido nicotínico el LPS de un mutante de *B. pertussis* defectivo en la expresión del gen *wlbI* presenta un perfil similar al observado por nosotros en *BbR1* (35). El avance en la genética

funcional y la bioquímica de diferentes rutas biosintéticas permitirá avanzar a nivel molecular sobre la identificación de los verdaderos genes blancos del sistema de dos componentes.

A diferencia de los dos moduladores descritos anteriormente, el descenso en la temperatura de crecimiento induce cambios diferentes en la estructura del LPS (Fig. II.3). Estos cambios no son del tipo cuantitativo, si no cualitativos ya que a 22°C las bacterias *BbR1* presentan un LPS con bandas adicionales de menor movilidad compuesta por lípido A-core-trisacárido y un número entero de monómeros constituyentes del antígeno O (Fig. II.3). Estas bandas adicionales se tiñen con la técnica específica para LPS y además no desaparecen con el tratamiento de proteasa por lo que es factible suponer que se trata de componentes propios de esta macromolécula. Esta modificación se presenta sin que se alteren apreciablemente las cantidades relativas de las bandas A y B. Esta banda adicional de menor movilidad observada en esta condición de cultivo no se hizo evidente al cultivar la bacteria en medios suplementados con los otros dos moduladores.

Estos mismos ensayos se repitieron con un aislamiento obtenido durante el período crónico de la infección (*BbR4*). En este caso no se pudo observar ninguno de los cambios antes descritos para *BbR1*. Este aislamiento carece del antígeno O quizás como consecuencia de tener alterada la funcionalidad de los genes que lo sintetizan. Esta podría ser la causa por la que no responde a la presencia de los agentes moduladores como ocurre en la cepa *BbR1*.

En concordancia con lo informado por van der Arker (1998) (45) respecto a la diferencia de sensibilidad a los moduladores de acuerdo al origen del aislamiento, nuestros ensayos empleando una cepa de origen animal, la cepa *Bb9.73*, mostraron que la misma no modifica la estructura de su LPS frente a los diferentes moduladores de igual forma que el aislamiento *BbR1* proveniente de una infección humana. Esta cepa a diferencia de *BbR1*, presenta una proporción mayor que en *BbR1* de LPS con una estructura completa lípido A-core-trisacárido-antígeno O. A su vez esta cantidad de antígeno O de *Bb9.73* se ve incrementada cuando la bacteria se cultiva en presencia tanto de iones sulfato como de ácido nicotínico. Estos resultados indicarían que los genes involucrados en el proceso de síntesis del antígeno O de *B. bronchiseptica* son los que están involucrados en la respuesta a los moduladores (36). Recientemente se han identificado en *Bordetella* los genes *wbmL* y *wbmM* que presentan homología con secuencias que codifican para proteínas de membrana involucradas en la exportación del antígeno O hacia el espacio intermembrana, en donde luego será unido a la estructura ya formada de lípido A-core (22, 41). Otro gen involucrado en este proceso codifica para una proteína que posee sitios de unión para ATP, denominado *wbmN*. La interrupción de cualquiera de estos genes impide la síntesis del antígeno O (36). Estos genes podrían estar regulados en forma directa o indirecta por el sistema de dos componentes dando como resultado un cambio en la eficiencia de agregado del antígeno O. Para completar la estructura final del LPS se necesitarán estudios adicionales para analizar más

específicamente cómo se modifica la expresión de estos genes en presencia de los moduladores utilizados.

En los ensayos utilizando bajas temperaturas de cultivo se pudo observar que la cepa *Bb9.73* presenta una disminución en la cantidad relativa de la porción correspondiente a un LPS completo (lípidos A-core-trisacárido-antígeno O) junto con la aparición de una banda adicional de mayor movilidad a la que denominaremos B'. La presencia de bandas con estas características fue observada en forma posterior por Preston y colaboradores (2003) (34). Estos autores observaron que la aparición de las mismas surge cuando se inactiva al gen *pagP* homólogo al presente en *Salmonella typhimurium*, responsable de la palmitoilización del lípido A del LPS. Este gen ha sido descrito como regulable por la presencia de sulfato de magnesio, lo que ha sido interpretado como una relación entre la estructura del lípido A y el sistema BvgAS. Sin embargo cuando el gen es reprimido por iones sulfato no es posible observar las bandas adicionales. Este aspecto controvertido no ha sido explicado aún en profundidad. Es por ello que no es posible descartar tanto en el caso reportado por Preston y colaboradores (2003) (34) como en el nuestro, que la aparición de la banda de mayor movilidad pueda ser producto de una disminución en el número de azúcares presentes en la estructura del core del LPS a través de un mecanismo aún no determinado.

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos muestran claramente que el efecto de la temperatura sobre la estructura del LPS tanto para la cepa *Bb9.73* como para el aislamiento *BbR1* es diferente al ocasionado por el resto de los moduladores (Fig. II.7). Este comportamiento diferencial respecto a los otros moduladores sugiere que el mecanismo por el cual resulta modificado el LPS en dicha condición se produciría a través de un sistema diferente a BvgAS. Con el fin de confirmar esta posibilidad se procedió a analizar el comportamiento frente a los diferentes moduladores de una cepa derivada de *Bb9.73* con el gen *bvgA* interrumpido. Esta cepa presenta una mutación definida en su genoma, lo que permite interpretar más claramente los resultados que se obtengan a partir de ella. En ausencia de moduladores, el mutante *bvgA*⁻ presenta al igual que la cepa parental, un LPS compuesto por las bandas A y B junto a una banda difusa de menor movilidad correspondiente al LPS con antígeno O. En presencia de iones sulfato o ácido nicotínico el mutante *bvgA*⁻ no presenta los cambios antes descritos para el LPS de la cepa parental indicando que la modificación antes producida es dependiente de la funcionalidad del sistema de dos componentes (Fig. II.8). A diferencia de lo informado por otros autores (45), pudimos observar que cuando las bacterias se cultivan a 22° C, el LPS obtenido a partir de la cepa con el sistema BvgAS bloqueado presenta el mismo perfil electroforético que de la cepa parental con el sistema activo pero modificado respecto al obtenido en ausencia del modulador. Este resultado indica que el efecto inducido por la temperatura sobre la estructura del LPS sería independiente de la actividad del sistema BvgAS. Estos resultados indicarían que existe otro mecanismo por el cual la bacteria es capaz de sensar los cambios de temperatura e inducir cambios en la estructura del LPS.

van den Akker (1998) observó una disminución en la producción y en el tamaño del antígeno O tanto en presencia de iones sulfatos como a bajas temperaturas. Sin embargo, en ninguno de ellos se observaron las bandas adicionales descritas en nuestros ensayos a bajas temperaturas. Las modificaciones en el LPS reportados por van den Arker fueron interpretadas como cambios dirigidos por el sistema de dos componentes BvgAS, interpretación que supuestamente fue confirmada mediante ensayos realizados sobre bacterias avirulentas espontáneas. La posible discrepancia de estos resultados con los nuestros puede deberse a que aquellos autores seleccionaron bacterias en fase avirulenta desconociendo el tipo de rearrreglo a nivel genómico que se había producido, por lo que no es posible descartar que los efectos observados se deban a alteraciones en sistemas diferentes a BvgAS.

Los resultados presentados en este capítulo indican que es posible regular la estructura del LPS al menos a través de dos mecanismos, uno teniendo como intermediario al sistema BvgAS y otro que es independiente de este último y que obedece a los cambios de temperatura del ambiente. El primero estaría involucrado en la regulación de la estructura de la parte distal del LPS, principalmente del antígeno O. En cambio, las estructuras más cercanas al lípido A, incluyendo al core estarían reguladas por temperatura. Las acción de sistemas de regulación distintos podría servir de estrategias más precisas para la adaptación del patógeno no sólo a a diferentes nichos ecológicos en los que esta bacteria es capaz de desarrollarse sino también a diferentes hospedadores. Así, durante el transcurso de las infecciones en los mamíferos que habitualmente infecta *B. bronchiseptica*, el LPS debe presentar una estructura completa, conteniendo antígeno O (22). La inclusión del hombre dentro del rango de hospedadores de *B. bronchiseptica* requiere quizás de modificaciones en LPS consistente en una disminución en la producción de esta porción distal del LPS para parecerse aún más a *B. pertussis*, un patógeno obligado del hombre. Una vez iniciado el proceso infeccioso en este nuevo hospedador, el mismo puede continuar hacia un período crónico para lo cual el patógeno debe presentar un LPS con estructura trunca. Si bien ninguno de los moduladores del sistema BvgAS son capaces de inducir un cambio en la estructura del LPS hacia una forma rugosa profunda no puede descartarse que otro modulador pueda actuar *in vivo* induciendo dichos cambios.

REFERENCIAS

1. Allen A., Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. Mol Microbiol. 19:37-52.
2. Amador C., Chiner E., Calpe J.L., Ortiz de la Table V., Martínez C., Pasquau F. 1991. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis. 13:771-772.
3. Arico B, Scarlato V, Monack DM, Falkow S, Rappuoli R. 1991. Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. Mol Microbiol. 5: 2481-91.
4. Banemann A., Gross R. 1997. Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. Infect Immun. 65:3469-3473.
5. Bauwens J.E., Spach D.H., Schacker T.W., Mustafa M.M., Bowden R.A. 1992. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. J Clin Microbiol. 30:2474-2475.
6. Belen O., Campos J.M., Cogen P.H., Jantusch B.A. 2003. Postsurgical meningitis caused by *Bordetella bronchiseptica*. Pediatr Infect Dis J. 22:380-381.
7. Bishop 2000 EMBO J 19:5071
8. Brockmeier S.L., Register K.B. 2000. Effect of temperature modulation and *bvg* mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. Vet Microbiol. 73:1-12.
9. Caroff M., Chaby R., Karibian D., Perry J., Deprun C., Szabo L. 1990. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. J Bacteriol. 172:1121-1128.
10. Caroff M., Aussel L., Zarrouk H., Martin A., Richards J.C., Therisod H., Perry M.B., Karibian D. 2001. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. J Endotoxin Res. 7: 63-8.
11. Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Chatfield S., Smith M., Novotny P., Morrissey P., Fairweather N.F. 1989. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:3554-3558.
12. Cotter P.A., Miller J.F. 1998. *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. Curr Opin Microbiol. 1: 17-26.
13. Cotter P.A., Yuk M.H., Mattoo S., Akerley B.J., Boschwitz J., Relman D.A., Miller J.F. 1998. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. Infect Immun. 66:5921-5929.
14. Falbo V., Pace T., Picci L., Pizzi E., Caprioli A. 1993. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. Infect Immun. 61:4909-14.
15. Finn T.M., Shahin R., Mekalanos J.J. 1991. Characterization of vir-activated TnphoA gene fusions in *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 59:3273-9.
16. Finn T.M., Stevens L.A. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. Mol Microbiol. 16:625-634.
17. Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R. 1997. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. Infect Immun. 65:4222-4228.
18. Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. FEMS Microbiol Lett. 162:331-337.
19. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. J Clin Microbiol. 33:2002-2006.
20. Guo L., Lim K.B., Poduje C.M., Daniel M., Gunn J.S., Hackett M., Miller S.I. 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. Cell. 95:189-98.
21. Guo D., Bowden M.G., Pershad R., Kaplan H.B. 1996. The *Myxococcus xanthus* *rfbABC* operon encodes an ATP-binding cassette transporter homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. J Bacteriol. 178:1631-9.
22. Harvill E.T., Preston A., Cotter P.A., Allen A.G., Maskell D.J., Miller J.F. 2000. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. Infect Immun. 68:6720-8.
23. Havarstein L.S., Hakenbeck R., Gaustad P. 1997. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. J Bacteriol. 179:6589-94.
24. Kasuga, T., Nakase Y., Ukishima K. And Takatsu K. 1954. Studies on Haemophilus pertussis. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. Arch Exp Med 27:57-62
25. Kerr J.R., Rigg G.P., Matthews R.C., Burnie J.P. 1999. The *Bpel* locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. Microb Pathog. 27:349-367.

26. Kinnear S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. 2001. Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun.* 69:1983-1993.
27. Knapp S., Mekalanos J.J. 1988. Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 170:5059-5066.
28. Kreikemeyer B., Mclver K.S., Podbielski A. 2003. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* 11:224-32.
29. Le Blay K., Gueirard P., Guiso N., Chaby R. 1997. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 143:1433-1441.
30. Merkel T.J., Stibitz S., Keith J.M., Leef M., Shahin R. 1998. Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 66:4367-4373.
31. Mesnard R., Guiso N., Michelet C., Sire J.M., Pouedras P., Donnio P.Y., Avril J.L. 1993. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12:304-306.
32. Michetti P., Svennerholm A.M. 2003. *Helicobacter pylori* - inflammation, immunity and vaccines. *Helicobacter.* 8:31-5.
33. Peppler M.S., Schrupf M.E. 1984. Phenotypic variation and modulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 44:681-7.
34. Preston A., Maxim E., Toland E., Pishko E.J., Harvill E.T., Caroff M., Maskeil D.J. 2003. *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol Microbiol.* 48:725-736.
35. Preston A., Thomas R., Maskeil D.J. 2002. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *wlb* LPS biosynthesis locus. *Microb Pathog.* 33:91-95.
36. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevens K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskeil D.J. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-7.
37. Register K.B., Ackermann M.R. 1997. A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infect Immun.* 65:5295-5300.
38. Roche R.J., High N.J., Moxon E.R. 1994. Phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide: characterization of lipopolysaccharide from individual colonies. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Jul 15;120(3):279-83.
39. Sigal L.H. 1997. Lyme disease: a review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 15:63-92.
40. Stainer D.W., Scholte M.J. 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* 63:211-220.
41. Sugiyama T., Kido N., Kato Y., Koide N., Yoshida T., Yokochi T. 1998. Generation of *Escherichia coli* O9a serotype, a subtype of *E. coli* O9, by transfer of the *wb** gene cluster of *Klebsiella* O3 into *E. coli* via recombination. *J Bacteriol.* 180:2775-8.
42. Ulrichs T., Kaufmann S.H. 2002. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci.* 7:d458-69.
43. Valverde C., Hozbor D.F., Lagares A. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques.* 22:230-2.
44. van Alphen L., Jansen H.M., Dankert J. 1995. Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:2094-9; discussion 2099-100.
45. van den Akker, W. (1998). Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiol.* 144:1527-1535.
46. van den Berg B.M., Beekhuizen H., Willems R.J., Mooi F.R., van Furth R. 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun.* 67:1056-1062.
47. Vereecke D., Comelis K., Temmerman W., Holsters M., Goethals K. 2002. Versatile persistence pathways for pathogens of animals and plants. *Trends Microbiol.* 10:485-8.
48. Viejo G., de la Iglesia P., Otero L., Blanco M.I., Gomez B., De Miguel D., Del Valle A., De la Fuente B. 2002. *Bordetella bronchiseptica* pleural infection in a patient with AIDS. *Scand J Infect Dis.* 34:628-629.
49. Wallet F., Perez T., Armand S., Wallaert B., Courcol R.J. 2002. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J Clin Microbiol.* 40:2300-2301.
50. Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST. 1997. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 65:943-50.
51. Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. 1983. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 42:33-41.
52. Weiss A.A., Falkow S. 1984. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 43:263-9.
53. Whitfield C. 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* 3:178-85.

CAPÍTULO III

Obtención de mutantes de *Bordetella bronchiseptica* que presenten un lipopolisacárido con una estructura alterada, similar a la de los aislamientos obtenidos de pacientes con infección crónica.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso infeccioso causado por *B. bronchiseptica* se ha observado que la bacteria modifica la expresión de diferentes componentes bacterianos. Como ocurre en numerosos patógenos, esta variación fenotípica podría ser una estrategia que emplea la bacteria para superar las defensas desarrolladas por el hospedador en las distintas etapas de la enfermedad. Aunque se han descrito diferentes estrategias de evasión para diferentes patógenos, la variación antigénica representa un mecanismo ampliamente difundido entre los patógenos (13, 15, 30, 34, 35, 87, 88, 96, 111, 112). Este fenómeno consiste en cambios en la estructura o la expresión en la totalidad de algún factor de virulencia y puede suceder a través de una modificación reversible o irreversible. Los mecanismos que pueden conducir a este proceso del encendido y apagado (*on-off*) de la expresión de determinados factores bacterianos, han sido clasificados en tres grandes categorías (134). El primero consiste en adquisiciones de material genético foráneo a través de mecanismos que incluyen la transducción, transformación y conjugación (45, 52, 124). En el segundo se agrupan aquellos que se producen debido a una alteración espontánea en alguna secuencia nucleotídica afectando la expresión de diferentes genes. Esta alteración pueden consistir en mutaciones puntuales (proteínas de membrana externa de *H. influenzae* (40), recombinaciones (lipoproteínas de *Borrelia hermsii*) (9, 67) o intercambio de promotores o genes (pilina y proteínas de opacidad en *N. Gonorrhoeae*) (60). Finalmente el tercer grupo, comprende aquellas variaciones que se encuentran reguladas por factores de transcripción que a su vez están regulados por algún sistema sensor de señales extracelulares. Un sistema de traducción de señales que está presente en varias bacterias Gram negativas son los sistemas de dos componentes (26, 36). A través de estos sistemas las bacterias sensan señales del medio exterior y traducen esa señal en cambios dentro de la bacteria que pueden repercutir en el metabolismo, virulencia, etc. de la misma.

Aún no se ha podido determinar dentro de qué grupo de los tres se clasificaría el comportamiento de *B. bronchiseptica in vivo*, quizás como consecuencia de la complejidad asociada a este patógeno ya que el mismo modifica tanto el perfil proteico como el de naturaleza polisacáridica. Es interesante remarcar que en general todos estos mecanismos que hemos descrito se han asociado a las variaciones de los componentes proteicos, siendo relativamente menor el número de ejemplos asociados con componentes de otra naturaleza. Sin embargo, no deberían minimizarse los estudios sobre la variación de los componentes no proteicos de la superficie bacteriana ya que durante la infección los mismos entran en contacto directo con el hospedador. Así, por ejemplo el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, que es el principal componente de la membrana externa (3, 77, 53), ha sido caracterizado como un factor importante en procesos de adhesión y colonización de diferentes tejidos (56). Se han descrito diversos mutantes que contienen un LPS con su

estructura alterada que presentan serias dificultades en lograr procesos infectivos de manera exitosa (Tabla III.1).

Tabla III.1. Rol del LPS de diferentes bacterias en el desarrollo de la infección.

Bacteria	Alteración/gen alterado	Observación	Referencia
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>rfaF</i>	Deficiente adherencia y colonización en células epiteliales.	110
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LPS core	Disminución de a adhesión a células epiteliales.	119
<i>Brucella suis</i>	<i>wbdA</i>	No puede evitar la fusión del fagosoma ue lo contiene con los lisosomas del macrófago.	93
<i>Brucella melitensis</i>	<i>wboA</i>	No previene la apoptosis de la célula en donde se aloja.	38
<i>Escherichia coli</i>	<i>waaQ</i>	No coloniza intestino murino.	85
	<i>rfaG, rfaP o galU</i>	No invade células eoiteliales.	41
<i>Shigella flexneri</i>	<i>galU</i>	No se disemina de célula a célula.	105
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>galE</i>	Sensibilidad aumentada a la acción bactericida del suero.	143
<i>Salmonella typhi</i>	Mutantes rugosos	Deficiencias en adhesión e invasión en células HeLa.	86
<i>Salmonella enterica</i>	<i>waaP</i>	Pérdida de virulencia y aumento en la sensibilidad a polimixina.	136
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutante espontáneo rugoso	Sensible a sistemas bactericidas de los macrófagos.	81
	<i>rfaE</i>	No invade células epiteliales.	65

El LPS además, es uno de los principales componentes hacia los cuales el sistema inmunológico eucariota se ha desarrollado a fin de reconocer la presencia de patógenos Gram negativos (43). La presencia de esta estructura en el hospedador induce una respuesta inflamatoria integrada por el aumento de numerosas citoquinas, moléculas de adhesión y factores tisulares (8). Esto muestra claramente el grado de capacidad de respuesta que han alcanzado los organismos pluricelulares a fin de reconocer y eliminar a este tipo de patógenos. La contraparte a este desarrollo ha sido la evolución de los mecanismos de evasión de los patógenos a fin de persistir dentro del hospedador. El LPS no ha escapado a esta co-evolución, más aún, se ha demostrado que en varios procesos infectivos bacterianos los cambios en la estructura del LPS a lo largo del proceso infectivo son necesarios para evadir la respuesta inmune preexistente o desarrollada con anterioridad en las primeras etapas de la infección (31, 100, 123, 130, 131). Se ha descrito para algunos patógenos que los mecanismos por los que se producen las variaciones en la estructura del LPS se corresponden con los descritos anteriormente para la variación antigénica. A manera de ejemplo podemos observar que *Helicobacter pylori* posee dos α 3-fucosiltransferasas

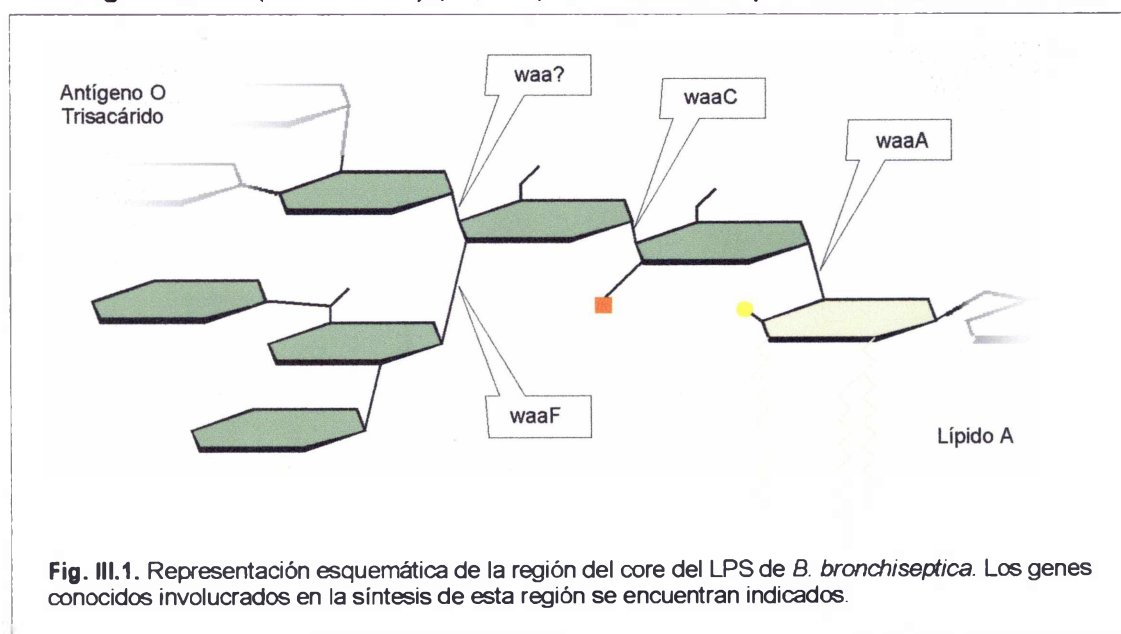
encargadas de agregar fucosas al LPS de esta bacteria. La región anterior al promotor de los genes que codifican para estas enzimas posee una zona rica en citosinas. La delección o agregado de una o más de estas bases durante la replicación del ADN permite o impide la correcta expresión de estos genes dando como resultado una variación de fase en la estructura del LPS. Se ha propuesto que esta variación posibilita a este patógeno persistir dentro del hospedador (4, 5, 127). Otro ejemplo de la expresión de diferentes variantes en la estructura del LPS es *Neisseria meningitidis*. Esta bacteria expresa al menos 13 tipos de lipooligosacáridos (LOS) inmunológicamente diferentes (61). Esta bacteria es capaz de intercambiar los distintos inmunotipos de los LOS a través de un proceso de variación que involucra diferentes puntos de terminación de los transcritos de ARNm (58,59). Se ha descrito que esta variación ocurre durante la infección y a ella se le ha adjudicado un rol fundamental para el éxito de la misma (29).

La infección causada por *Bordetella bronchiseptica* no sería la excepción en cuanto a que se ha podido observar que el LPS sufre cambios en su estructura a lo largo del ciclo infeccioso en humanos (48). El LPS de *B. bronchiseptica* en las primeras etapas de la infección consiste en una estructura del tipo *smooth* o completa con un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-2,3-di-N-acetilglactosaminurónico como antígeno O. En cambio en los aislamientos provenientes de infecciones crónicas, la estructura del LPS es del tipo rugoso profundo o *deep rough*. Esta estructura se caracteriza por la ausencia de la mayoría de los azúcares que conforman el core o núcleo que es la porción sacarídica más cercana al lípido A. El mecanismo por el cual este cambio observado *in vivo* se produce es aún desconocido. La falta de un conocimiento acabado sobre la genética y estructura de este componente han sido un obstáculo en el avance de la comprensión del rol que juega esta molécula en la infección. Además, los primeros trabajos sobre el LPS fueron realizados para *B. pertussis* y enfocados en la determinación de la composición y estructura de esta macromolécula (18, 19, 74, 90). Estos estudios fueron más tarde extendidos a las otras especies de *Bordetella* y complementados con la identificación de alguno de los genes involucrados en su síntesis (1, 2, 16, 94, 95) (Fig. I.6). En particular, se describió un grupo de genes que participan en la síntesis del LPS, a los que se los subdividió en loci según sus probables funciones. El locus denominado *wlb* en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* codifica polipéptidos que intervienen en la síntesis de un trisacárido que forma parte del núcleo externo. La ausencia de este trisacárido en *B. parapertussis* parece estar asociada a mutaciones puntuales en el gen *wlbH* (2). Otro grupo de genes a los que se denominó *wbm* participan en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* en la síntesis del antígeno O. En *B. pertussis*, los genes *wbm* se encuentran reemplazados por una secuencia de inserción (IS) por la que esta especie no presenta antígeno O en su LPS (83, 94).

Este conocimiento sobre la parte distal del LPS ha permitido evaluar la importancia de esta región en la colonización de *Bordetella* (16). Estos estudios fueron focalizados fundamentalmente hacia los estadios tempranos de la infección pero no se extendieron hasta

la etapa de cronicidad. Sin embargo, los cambios en la estructura del LPS se han registrado en los procesos crónicos y los mismos parecen involucrar al core del LPS (98). Es entonces clara la falta de conocimiento sobre el rol del LPS y sus cambios estructurales a lo largo de todo el proceso infeccioso incluyendo el periodo de cronicidad de la infección. Esta etapa de la infección reviste vital importancia epidemiológica, ya que transcurre de manera asintomática contribuyendo a la existencia de portadores sanos que diseminan silenciosamente al patógeno a la población susceptible.

Con el fin de avanzar en el conocimiento del rol del LPS y su variación fenotípica en la patogenicidad y persistencia de *B. bronchiseptica* en el hospedador decidimos construir y caracterizar tanto *in vitro* como *in vivo* mutantes defectivos en la síntesis del LPS. En una primera etapa dado que en ese momento no se disponía aún de un conocimiento acabado de los genes involucrados en la síntesis del LPS de *Bordetella*, se realizó una mutagénesis al azar empleando el transposón Tn5. Luego de la transposición y con el fin de seleccionar aquellos mutantes que presentaran un fenotipo rugoso profundo en su LPS, similar al observado en los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos en la fase crónica de la enfermedad, se utilizaron criterios específicos de selección para ese fenotipo ya descriptos en otras bacterias (108). En una segunda etapa ya con la disponibilidad de los datos de secuencia de algunos genes involucrados en la síntesis del LPS de *Bordetella* (1, 94) decidimos construir específicamente un mutante defectivo en la expresión de genes que condujeran a una estructura del LPS lo más rugosa profunda posible (Fig. III.1). Dado que la mutación del gen *waaA* (antes *kdtA*) (97, 108) ha sido descripta como letal, se decidió alterar



la expresión del gen *waaC*, responsable del agregado de la primera heptosa. De esta manera el mutante produciría un LPS compuesto por el lípido A y una molécula de KDO, descripta como la mínima porción necesaria para que otras bacterias sean viables (108). Todas las

construcciones obtenidas fueron utilizadas para realizar los estudios de caracterización tanto *in vitro* como *in vivo* empleando el modelo de infección intranasal de *Bordetella* en ratones.

A continuación se detallan los materiales y métodos utilizados a fin de realizar los mutantes descritos previamente y el posterior análisis de su rendimiento en el desarrollo de un proceso crónico de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la *Tabla III.2*. Las suspensiones bacterianas se conservaron como liofilizados y/o a -20°C en glicerol.

1.1. *Bordetella*. Los liofilizados bacterianos se resuspendieron en una solución de casaminoácidos al 1% p/v y se plaquaron en el medio sintético de Stainer – Scholte (SS) sólido suplementado con 15% v/v de sangre desfibrinada de caballo (SSs). La composición del medio SS se describe en el Apéndice de esta tesis. Las bacterias se cultivaron durante 48 hrs. a 37°C . y luego se subcultivaron por 24 hrs. en placas SSs a 37°C .

Para inducir la modulación de fase de las bacterias, es decir la variación desde un estado virulento a uno avirulento, se transfirió el crecimiento en placas SSs a otras placas conteniendo MgSO_4 40 mM como agente modulador .

1.2. *Escherichia coli*. Para el cultivo de este microorganismo se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) (104) suplementado con antibióticos en los casos en que eran necesarios.

1.3. Antibióticos. Cuando fueron requeridos, se adicionaron a los medios de cultivo soluciones concentradas de los mismos. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ($\mu\text{g ml}^{-1}$):

para *E. coli*: Kanamicina (Km) 25; Gentamicina (Gm) 10 y Ampicilina (Amp) 200.

para *Bordetella*: Estreptomicina (Sm) 200, Gentamicina (Gm) 50, y Kanamicina (Km) 80.

2. Plásmidos y ADN genómico

2.1. Purificación de plásmidos. Los plásmidos utilizados y sus características más relevantes se describen en la *Tabla III.2*. Para la purificación de plásmidos se utilizó la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook y col. (1989) (104). La composición de las soluciones empleadas se encuentran en el Apéndice de este trabajo de Tesis (pág. 185) . Para la precipitación de los plásmidos se empleó isopropanol en una relación de volúmenes 1:1 y luego de centrifugar, el sedimento se lavó con etanol 70% v/v. Para la resuspensión de los plásmidos se empleó 20 μl de agua libre de ADNasas conteniendo ARNasa (1 mg ml^{-1}).

Tabla III.2. Cepas y plásmidos utilizados en el presente capítulo.

	Características principales	Referencia
Cepas		
<i>B. bronchiseptica</i> CIP9.73	Obtenido de un aislamiento de conejo. LPS liso. BvgAS ⁺ . AC-Hly ⁺ . PRN ⁺ . FHA ⁺ . Sm ^r	73
<i>B. pertussis</i> Tohama I	Cepa vacunal. BvgAS ⁺ . AC-Hly ⁺ . PRN ⁺ . FHA ⁺ . PTX ⁺ Sm ^r	63

<i>B. bronchiseptica</i> GFP (BbGFP)	Derivada de Bb9.73 conteniendo el plásmido pGB5P1. Fluorescente. LPS liso. Hemolítica. Sm ^r . Km ^r	Esta Tesis.
<i>B. bronchiseptica</i> LP39 (BbLP)	Mutante defectivo en waaC obtenido a partir de Bb9.73 por mutagénesis insercional sitio específica. LPS rugoso profundo. Hemolítica. Sm ^r . Km ^r	Esta Tesis.
<i>B. bronchiseptica</i> Tn5 (BbTn5)	Mutante LPS alterado obtenido a partir de Bb9.73 por transcojugación con Tn5. LPS rugoso profundo. Hemolítica. Sm ^r . Km ^r	Esta Tesis
<i>E. coli</i> DH5 α	RecA, Δ lacU169, Φ 80d/lacZ Δ M15	Bethesda Res. LaB.
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	115
Plásmidos		
pSUP1021	Km ^r Tn5	115
pk18mob	Mob Km ^r	106
pGB5P1	Mob Gn ^r GFP derivado de pBBR1MCS-2	129
pgemT-Easy	Vector multicopia Amp ^r	Promega
pCW504	Mob Km ^r Gn ^r GFP derivado de pBBR1MCS-2	129

2.2. Extracción de ADN genómico. Para la obtención de ADN genómico, las células provenientes de un cultivo sólido o líquido se resuspendieron en N-lauril sarcosina 0,1% p/v en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8 (TE) y se lavaron con NaCl 1 M. Luego de una centrifugación a 8.000 X g durante 5 minutos, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 500 μ l sacarosa 10% p/v en TE conteniendo lisozima 1 mg ml⁻¹. Luego de 1 hora de incubación a 37° C, se agregaron 100 μ l de pronasa (2,5 mg ml⁻¹ de TE). La suspensión fue mezclada por inversión y se incubó a 37° C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo se le agregó 70 μ l de NaAc 3 M, 100 μ l de cloroformo y 200 μ l de solución de Fenol-Tris-HCl pH 8.00. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 22000 X g y la fase superior acuosa obtenida se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la extracción fenólica. Recogida la fase acuosa se procedió a la precipitación del ADN mediante la adición de 3 volúmenes de etanol 96% v/v frío (-20°C). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% v/v, luego de evaporar todo el alcohol, el ADN se resuspendió en 25-50 μ l de agua al que se añadió 1 μ l de una solución de ARNasa 1mg ml⁻¹.

2.3. Determinación de la concentración de ADN plasmídico o genómico. Para la cuantificación de ADN se empleó el método espectrofotométrico (104). La absorbancia de las preparaciones de ADN fueron medidas a 260 y 280 nm. Las concentraciones fueron estimadas considerando que una DO_{260nm}=1 corresponde a las siguientes concentraciones: 50 μ g ml⁻¹ de ADN de cadena doble, 40 μ g ml⁻¹ de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 μ g ml⁻¹ de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm} / DO_{280nm} se utilizó como estimadora de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN de baja pureza o baja

concentración se empleó preferencialmente el método de comparación de fluorescencias en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y col. (1989) (104).

2.4. Electroforesis de ADN. El análisis cualitativo de las muestras de ADN y la separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2% p/v) empleando Tris-HCl 89 mM, Na₂EDTA 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2 (TBE) como buffer de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 5 µl solución de ADN en agua por cada 1 µl solución de carga.

2.5. Revelado de los geles. Para la visualización del ADN sobre los geles de agarosa se adicionó a los mismos 0,5 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio. Este compuesto permite la visualización del ADN por transiluminación con luz ultravioleta. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara Polaroid o con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

2.6. Tratamientos enzimáticos del ADN. Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones propuestas por las casas comerciales (Boehringer o Promega) y las recomendaciones descritas en Sambrook y col. (1989). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 µg de ADN, y 5-10 unidades de la enzima a utilizar en un volumen final de 10-25 µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima durante un período de tiempo no menor a 1 hora.

2.7. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa. Para la determinación de los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos luego del tratamiento con enzimas restricción, se realizó una electroforesis de los mismos en geles de agarosa junto a un marcador de peso molecular. Luego de la electroforesis se representó una curva con el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido del marcador molecular frente a la movilidad de cada uno de esos fragmentos. A partir de la misma y por interpolación se determinó el tamaño de los fragmentos analizados. Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII*.

2.8. Electrotransformación de *E. coli*. Preparación de células electrocompetentes. La transferencia de ADN hacia el interior de *E. coli* se realizó por electroporación usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200Ω, 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a la suspensión bacteriana 1 ml de medio SOC (la composición de este medio se describe en el Apéndice de esta Tesis, (pág. 186) o LB, y la mezcla se incubó 1 hora a 37° C para permitir la replicación del plásmido. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo e incubadas durante una noche a 37° C.

Cuando fue necesario se agregó previamente a las placas 50 μl de solución de X-Gal 20 mg ml^{-1} en dimetilformamida.

Para la preparación de bacterias electrocompetentes se utilizó la técnica de Wai Ling Tung y King Chuen Chow (1995) (120). Las bacterias se cultivaron en el medio LB a 37° C con agitación de 180 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8 unidades. Las células así obtenidas fueron centrifugadas a 2000 X g por 15 min. a 4° C y lavadas 2 veces con glicerol 10% v/v a 4° C. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de glicerol 10% v/v, 0,125% p/v extracto de levadura, 0,25% p/v triptona (GYT) a 0° C. La suspensión bacteriana así obtenida se fraccionó en alícuotas de 100 μl y se conservó a -80° C hasta el momento de ser utilizadas.

3. Construcción de una cepa de *B. bronchiseptica* marcada con la proteína fluorescente verde y una nueva resistencia a antibiótico

Con el fin de obtener una cepa isogénica a *Bb9.73* que presente una resistencia a un antibiótico adicional a los presentes naturalmente se introdujo por conjugación biparental el plásmido pGB5P1 (Km^r , gentilmente provisto por la Dra. Weiss de University of Cincinnati, Cincinnati Ohio, EEUU) que contiene el gen que codifica para la proteína verde (*green fluorescen protein*, GFP) en *Bb9.73*. El gen que codifica para la GFP se encuentra modificado en su secuencia de manera que la intensidad de fluorescencia a 488 nm se encuentra incrementada unas 100 veces respecto a la proteína salvaje (22). Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon y col. (1983) (115) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno se mezclaron iguales volúmenes de un cultivo de la cepa donadora *E. coli* S17-1 ($\text{DO}_{650\text{nm}} = 0,4-0,5$) conteniendo el plásmido pGB5P1 y de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora *Bb9.73*. La mezcla fue centrifugada a 700 x g durante 8 min. y el sedimento resuspendido suavemente en aproximadamente 50 μl de medio líquido SS. La suspensión se colocó en una caja de Petri conteniendo el medio SSs sin antibióticos. Luego de una incubación a 37° C durante toda la noche, se resuspendieron la bacterias en medio líquido SS y se plaquearon en medio SSs suplementado con estreptomicina (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y kanamicina sulfato (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$). En forma paralela se realizaron controles en los que sólo se agregó la bacteria donadora o la receptora. Los transconjugantes resistentes a ambos antibióticos ser evaluaron posteriormente en su capacidad de emitir fluorescencia a 488 nm como consecuencia de la expresión de la proteína GFP. A su vez se determinó la presencia del plásmido pGB5P1 a partir de una minipreparación del transconjugante fluorescente.

4. Construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de un único factor bacteriano

4.1. Mutagénesis al azar empleando el transposón Tn5. Como primera estrategia en la construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* que presentaran un LPS con estructura alterada, empleamos al transposón Tn5. Este transposón, contenido en un plásmido suicida en *Bordetella* pSUP1021 fue transferido por conjugación desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 a la cepa de *Bordetella* receptora, en nuestro caso Bb9.73.

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon y colaboradores (1983) (115) con las modificaciones indicadas anteriormente. La mezcla de bacterias en esta oportunidad fue plaqueada en medio SSs suplementado con estreptomicina ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) y sulfato kanamicina ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$). Se aislaron y conservaron a -80°C aquellos transconjugantes resistentes a ambos antibióticos.

4.2. Mutagénesis insercional sitio específica. Esta metodología consiste en clonar una secuencia de ADN interna a la región codificante del gen a interrumpir en vectores movilizables y suicidas en *Bordetella*. Estos plásmidos son transferidos por conjugación a cepas de *Bordetella* y luego se seleccionan por resistencia a antibióticos los transconjugantes que hayan integrado al plásmido recombinante mediante un simple evento de recombinación homóloga (Fig. III.2). A continuación se detalla en forma conjunta la metodología común que se siguió para la construcción de los mutantes defectivos en la expresión de una heptosil transferasa (mutante denominado BbLP39), o en la expresión de Adenilato ciclasa hemolisina (mutante denominado Bbcya⁻).

El fragmento interno a la región codificante de cada uno de los genes a interrumpir se obtuvo por PCR empleando secuencias oligonucleotídicas (cebadores o primers) diseñadas por nosotros en base a la secuencia del gen de interés previamente reportada (Tabla III.3). En todos los casos los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology). La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ albúmina bovina (BSA); 3 mM MgCl_2 ; 200 μM dNTPS; 2 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 μM de cada uno de los cebadores (*primers*) para PCR específicas. Los cebadores fueron sintetizados por DNAgency (Malvern, PA, USA). La mezcla de reacción fue sometida durante 15 segundos a 94°C , 35 ciclos (15 segundos a 94°C , 10 segundos a 53°C y 15 segundos a 72°C) y por último 30 segundos a 72°C para permitir la finalización de todas las cadenas de ADN amplificadas. Finalizada la reacción de PCR, 10 μl del producto fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% p/v conteniendo 0,5-1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado como se describió más arriba usando una cámara digital Kodak modelo DC 290 bajo iluminación ultravioleta.

Los ADN moldes para la amplificación por PCR fueron obtenidos mediante lisis de bacterias por calor o por extracción fenólica (ver sección 2.2. de este capítulo, pág. 85). Para realizar la lisis por calor, las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos (10^8 - 10^9 UFC) fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 100 μl agua bidestilada estéril. La suspensión así obtenida fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 22000 X g durante 4

minutos. Los sobrenadantes que se obtuvieron fueron usados como ADN molde para la reacción de PCR.

Una vez obtenido el producto de amplificación del tamaño esperado según los primers

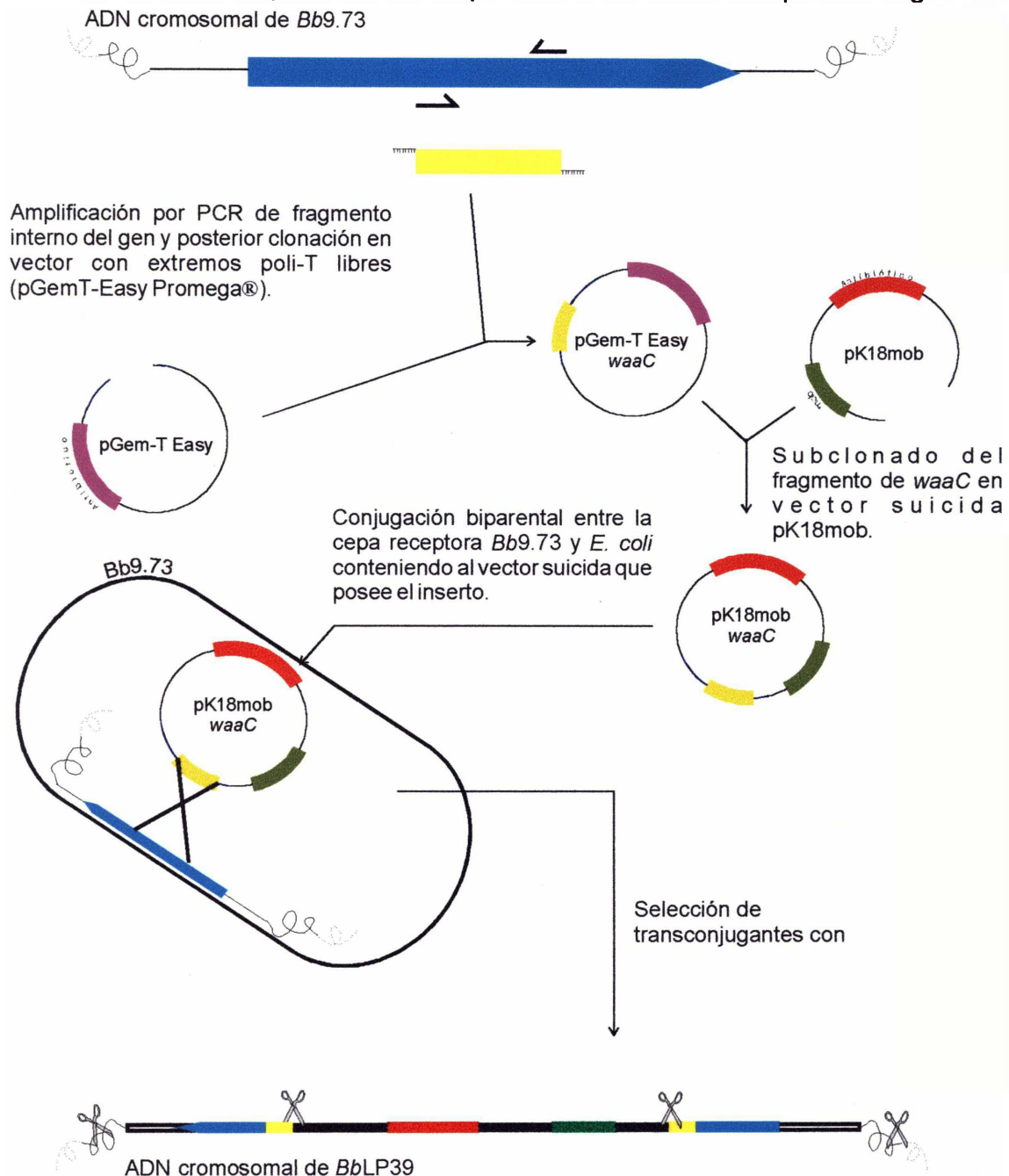


Fig. III.2. Esquema de construcción de mutantes por inserción sitio específica de un fragmento interno del gen a interrumpir. En la parte inferior de la figura se puede observar un detalle del arreglo genómico que lleva a la mutación deseada. Se indica con ✂ los sitios de corte de la enzima de restricción EcoRI, utilizada en los ensayos de Southern blot.

utilizados, el mismo se clonó en el vector pGemT-Easy (Promega) y se transfirió por electroporación a la cepa *E. coli* DH5 α . Una vez confirmada la presencia de un inserto del tamaño esperado por análisis con enzimas de restricción y por secuenciamiento, el fragmento fue subclonado a un plásmido suicida en *Bordetella* (pG18mob o pG18mob según

se detalla en la Tabla III.3). Luego las construcciones fueron transferidas a *E. coli* S17-1 y desde allí por conjugación a cepas de *Bordetella*.

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon y colaboradores (1983) (115) con modificaciones menores según se indicara en la sección 3. La mezcla de bacterias fue resuspendida en medio líquido SS y plaqueada en medio SSs suplementado con los antibióticos indicados en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Secuencias oligonucleotídicas, vectores y estrategia de selección utilizados en la construcción de mutantes de *B. bronchiseptica* defectivos en la expresión de *waaC* o de *cya*.

Mutante construido.	Primers utilizados para amplificar la región interna del gen codificante a mutar.	Vector suicida.	Selección del mutante.
Mutante defectivo en la expresión de <i>waaC</i> (<i>BbLP39</i>)	<i>waaC_r</i> 5'- TTCAICAGCCCCTG -3'	pK18mob Km ^r	Km ^r Sm ^r Sensibilidad a detergentes
	<i>waaC_{Rn}</i> 5'- CCAGATTGACGGGT -3'		
Mutante defectivo en la expresión de AC-Hly (<i>Bbcya⁻</i>)	<i>cya_r</i> 5'-CACCCACAGGACTCCCAG-3'	pK18mob Km ^r	Km ^r Sm ^r Actividad hemolítica
	<i>cya_r</i> 5'- TCAAGCATCGCCATCTCA -3'		

5. Selección de transconjugantes.

5.1. Selección de transconjugantes con alteraciones en la estructura del LPS (*BbTn5* y *BbLP39*) por sensibilidad a SDS. Para la selección de los mutantes con alteraciones en la estructura del LPS se emplearon ensayos de sensibilidad a detergentes ya que para este tipo de mutantes se describió que la misma se encuentra alterada. Para ello, las colonias transconjugantes resistentes a los antibióticos estreptomycin y kanamicina se repicaron en medio SS agarizado conteniendo SDS 0,02% p/v y en SSs suplementado con los antibióticos mencionados. La concentración de SDS utilizada correspondió a aquella que permite el crecimiento de una cepa con su LPS completo pero no de aquellas que presentan alteraciones profundas en esta estructura. Aquellos clones que en presencia de SDS no se desarrollaron luego de 48 horas de incubación a 37° C fueron seleccionados y a partir de ellos se realizaron los estudios de caracterización que se describen más abajo.

5.2. Selección de transconjugantes defectivos en la expresión de AC-Hly (*BbcyaA⁻*). Las colonias obtenidas luego de la conjugación entre la cepa donadora *E. coli* S17-1 conteniendo al plásmido *pk18mob::cya* y la cepa *B. bronchiseptica* 9.73, resistentes a los antibióticos estreptomycin y kanamicina fueron repicados en medio SSs. Como primer paso de selección de los posibles clones que contengan una interrupción en el gen *cyaA* se analizó la ausencia de halos de hemólisis en el medio SSs ya que la toxina AC-Hly es la responsable de la actividad hemolítica. Aquellos clones que no desarrollaban hemólisis luego de 16 horas de incubación a 37° C fueron seleccionados para ser analizados posteriormente desde el punto de vista de la estructura génica.

6. Análisis génico de las construcciones realizadas

Para analizar las estructuras génicas obtenidas luego de las mutaciones se empleó la técnica de Southern blot (116). Para ello se procedió a la obtención de ADN de los transconjugantes y de la cepa *Bb9.73*. Estos se trataron con la endonucleasa de restricción *EcoRI*, y luego de la incubación con dicha enzima los productos obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0.8 % p/v a 1-2 volt/cm. Una vez finalizada la corrida se visualizó el ADN por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV y a continuación, el gel se transferió a una membrana de nitrocelulosa o nylon (Nylon N -Hybond) mediante el método alcalino descrito por Chomczynski (21). Este método consiste en primer lugar en una incubación del gel de agarosa en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M y NaCl 3,0 M) durante 1 hora. Luego el gel se lavó durante 15 minutos con la solución de transferencia (8 mM de NaOH y 3,0 M de NaCl , pH 11,4) y se colocó entre papeles absorbentes y sobre la membrana Hybond formando un puente de papel por el que circuló la solución de transferencia por capilaridad durante una hora. Transcurrido ese lapso de tiempo, la membrana se neutralizó con tampón fosfato a pH 6,8 (NaH₂PO₄ 0,2 M, Na₂HPO₄ 0,2 M) por 10 minutos para provocar la renaturalización del ADN. Se secó la membrana a 80° C y finalmente se fijó el ADN mediante exposición a luz UV de $\lambda = 260$ nm durante 10 minutos.

La membrana se prehibridó con una solución conteniendo ADN de esperma de salmón (ver la composición en el Apéndice de este trabajo, pág 185) durante 1 hora a 58° C. Posteriormente se procedió a la hibridación con una sonda marcada con digoxigenina (DIG) a 58° C suspendida en buffer de prehibridación durante toda la noche. Estas sondas fueron preparadas por PCR con digoxigenina-11-dUTP en las concentraciones indicadas en el producto DIG Nucleic Acid Kit de Boehringer Mannheim empleando las mismas condiciones de amplificación que las antes descritas. Luego de la hibridación, la membrana se lavó de la siguiente manera: dos lavados con 2 X SSC-SDS 0.1% p/v a temperatura ambiente y dos lavados con 0,1 X SSC-SDS 0,1% p/v a 60 °C. Luego se incubó la membrana en una solución bloqueante conteniendo 1% p/v en Tris-HCl 100 mM NaCl 150 mM pH 7,5 durante 1 hora a 30° C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se agregó el anticuerpo específico para digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (dilución de 1/1000 en la solución anterior). La membrana en estas condiciones se incubó durante al menos 1 hora a 30° C. Se retiró el exceso de anticuerpo mediante dos lavados de 15 minutos cada uno con Tris-HCl 100 mM NaCl 150 mM pH 7,5, para luego equilibrar la membrana durante 3 minutos con Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM pH 9,5. Se agregó los sustratos de fosfatasa alcalina 9 μ l NBT, 7 μ l BCIP en 2 ml de Tris-HCl 100 mM NaCl 100 mM MgCl₂ 50 mM pH 9,5 de manera de lograr el desarrollo de color. La reacción de coloración fue detenida con agua destilada en el momento adecuado.

7. Complementación del fenotipo rugoso profundo de *BbLP39* mediante el empleo de una biblioteca genómica construida en vectores movilizables y replicativos en *Bordetella*

Con el fin de revertir el fenotipo presente en *BbLP39* se construyó una biblioteca genómica de *Bb9.73* en un vector replicativo en *Bordetella*.

7.1. Construcción de una biblioteca genómica de *B. bronchiseptica* 9.73 y complementación *in trans* de *BbLP39*. Primeramente se procedió a la obtención de ADN de la cepa *Bb9.73* mediante la técnica descrita en la sección 2 de este capítulo. El ADN así obtenido se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *SacI* de manera de obtener tamaños de ADN de alrededor de 5 Kpb. El plásmido pCW504 movilizable (gentilmente donado por la Dra. A. Weiss (Molecular Genetics, Biochemistry & Microbiology, University of Cincinnati, Ohio, USA) y replicativo en *Bordetella* también se digirió con las mismas enzimas. Una vez digeridos ambos ADN, los mismos se ligaron y el producto de ligación se electroporó en *E. coli* S17-1. Las bacterias transformadas se sembraron en medio LB sólido con kanamicina y gentamicina. A partir de las colonias Km^r-Gm^r se aislaron plásmidos los cuales fueron evaluados por digestión con *SpeI* y *SacI* para determinar el tamaño promedio de los insertos presentes. La biblioteca así obtenida se transfirió en masa a *BbLP39* por conjugación biparental. Los transconjugantes fueron evaluados de acuerdo a la resistencia a antibióticos y a su capacidad de crecer en presencia de SDS 0,02% p/v. Aquellos transconjugantes Gm^r e insensibles al SDS fueron seleccionados. A partir de los mismos se extrajo el plásmido y sobre este verificó la presencia del gen *waaC* mediante ensayos de PCR utilizando los primers *WaaCtotal_r* y *WaaCtotal_f* (5'-GTATTCTCATCGTTGCACC-3' y 5'-CAACGCCAGGGTATAGACG-3' respectivamente). Una vez confirmado, el plásmido fue introducido nuevamente en *BbLP39* para verificar que el inserto era capaz de complementar el fenotipo rugoso profundo.

8. Caracterización *in vitro* de los mutantes obtenidos

A fin de caracterizar fenotípicamente cada uno de los mutantes obtenidos se realizaron los siguientes experimentos:

Mutante de *B. bronchiseptica* que presenta un LPS con estructura alterada (*BbLP39*)

8.1. Aislamiento del lipopolisacárido de *Bordetella* y análisis en geles de SDS-PAGE. Los LPS de las diferentes cepas utilizadas y construidas en este capítulo fueron aislados y analizados mediante corridas electroforéticas como ha sido descrito en el capítulo II (pág. 64).

8.2. Funcionalidad del sistema BvgAS. Con el fin de determinar si el sistema de dos componentes BvgAS no se encontraba alterado en su sensibilidad a los moduladores conocidos *in vitro* se procedió a analizar la expresión de algunos factores regulados por este

sistema en presencia y ausencia de agentes moduladores. Los diferentes mutantes, junto a la cepa parental fueron cultivadas en presencia de iones sulfato, ácido nicotínico o crecimiento a temperaturas menores de 22° C. Una vez crecidos en estas condiciones, se analizó su actividad hemolítica (marcador de virulencia) en cajas SSs y si presentaban movilidad (marcador de avirulencia) en agar blando. En ocasiones se determinó a su vez por western blot la presencia o ausencia de alguno de los marcadores de virulencia y avirulencia más conocidos.

8.3. Curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento de la cepa *BbLP39* se realizaron en comparación con la correspondiente de la cepa parental en erlenmeyers con medio SS a 160 rpm y 37° C. El inóculo se realizó a partir de un cultivo en medio SSs el cual que fue resuspendido para obtener una DO_{650nm} inicial de 0,2. La cinética de crecimiento se siguió a través de lecturas de absorbancia a 650 nm y unidades formadoras de colonias (UFC). Para la determinación de UFC se sembraron diluciones adecuadas en medio SSs con los antibióticos correspondientes las cuales se incubaron durante 48 hs a 37° C. Transcurrido dicho tiempo se procedió al recuento de colonias.

8.4. Obtención de proteínas de membrana externa. Para la obtención de proteínas de membrana externa se empleó el método descrito por Schnaitman (109) que se basa en la diferencia de solubilidades en detergente de éstas respecto a las de la membrana citoplasmática. Brevemente, las células provenientes de 10 ml de cultivo se concentraron por centrifugación, se lavaron y resuspendieron en HEPES 10 mM (N-2-hidroximetilpirazina-N-2-ácido etansulfónico) pH 7,4. Después de una sonicación refrigerada de 2 minutos las células enteras se removieron por centrifugación a 300 X g 10 minutos a 4° C. La cubierta de las células se sedimentaron a partir del sobrenadante anterior por centrifugación (20000 X g 60 min. 4° C). El sedimento se resuspendió en HEPES 10 mM conteniendo 2% v/v Tritón X-100 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El material insoluble se sedimentó por centrifugación (20000 X g 60 min. 4° C) y se repitió la extracción con Tritón X-100 en HEPES 10 mM. El sedimento final es resuspendido en 40 μ l de agua y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford utilizando como patrón seroalbúmina bovina (14). Las proteínas así obtenidas luego se analizaron mediante corridas electroforéticas como se describe a continuación.

8.5. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las preparaciones de proteínas de membrana externa o proteínas totales preparadas a partir de lisis bacterianas ($DO_{650nm} = 6,0$) con buffer de Laemmli (71), se sometieron a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, con SDS y β -mercaptoetanol. Los geles de poliacrilamida se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (71). En todos los casos el gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en buffer Tris-HCl a pH 6,8 y SDS 1 μ g ml^{-1} , mientras que el gel de separación se preparó en una concentración del 12,5 a 15 % de poliacrilamida según se indica en las leyendas de las figuras

(acrilamida:bisacrilamida 29:1) con Tris-HCl a pH 8,8 y SDS 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las corridas se llevaron a cabo durante 60 a 90 minutos en equipos Miniprotean (BioRad) a 100-120 volts utilizando buffer de corrida cuya composición se describe en el apéndice de esta Tesis. Una vez finalizada la corrida, los geles se fijaron en metanol:acético:agua (volúmenes 50:10:40) y se tinieron con Coomassie Blue y/o con plata.

8.6. Inmunoensayos de proteínas o de LPS (*western blot*). Los anticuerpos utilizados en estos ensayos se detallan en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Sueros policlonales utilizados en el presente capítulo.

Anticuerpo	Características principales	Referencia
a-PRN	Policlonal de cobayo específico para pertactina.	Instituto Pasteur. Francia
a-FHA	Policlonal de ratón específico para hemaglutinina filamentosa	Instituto Pasteur. Francia
a-AC-Hly	Policlonal de ratón específico para adenilato ciclasa-hemolisina	Esta Tesis
a-LPS	Policlonal de ratón específico para LPS de <i>Bb9.73</i>	Esta Tesis
a-IgG ratón Fosfatasa Alcalina	Policlonal en cabra específico para IgG de ratón (H+L), conjugado con fosfatas alcalina.	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.

Las muestras de proteínas o LPS ya sometidas a SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon™, Millipore) mediante el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. En primer instancia se armó el dispositivo de transferencia con el gel a transferir y la membrana previamente tratada con buffer de transferencia (ver composición en el apéndice de la Tesis). Una vez armado, se le aplicó sobre el mismo una diferencia de potencial de 100 volts durante 1 hora en baño de agua-hielo. Transcurrido dicho tiempo en el caso de una muestra de proteínas, se verificó la correcta transferencia mediante una tinción con Rojo Ponceau S (0,1 % p/v Ronjo Ponceau en ácido acético 5% v/v). Para continuar tanto con el inmunoblot de proteínas como del LPS, se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% p/v de leche en polvo descremada en TBS cuya composición se describe en el apéndice de esta tesis. Posteriormente se reemplazó la solución de bloqueo por una solución al 5% p/v de leche descremada en TBS (TBS - leche) conteniendo el anticuerpo a utilizar. La membrana se incubó con dicha solución durante toda la noche a 4° C y con agitación suave. Se retiró la solución del anticuerpo y se realizaron seis lavados con Tween 80 0,05% v/v en TBS - leche. Se adicionó el segundo anticuerpo policlonal en cabra específico para IgG de ratón (H+L), conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS - leche y se incubó con agitación lenta durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS - leche y un lavado final con buffer para fosfatasa alcalina (PA) (composición en Apéndice, pág. 185). En el momento del revelado se prepara una

solución que contiene el sustrato de la fosfatasa alcalinas consistente en 44 μl de NBT y 33 μl de BCIP en 10 ml de PA. Se deja en dicha solución hasta desarrollo de color moento en que se detiene la reacción con agua destilada.

Los sueros policlonales que reconocen componentes de *Bb9.73* se obtuvieron de la siguiente manera: en primer lugar se procedió a la purificación de cada uno de los componentes utilizando técnicas apropiadas: para el LPS la descripta en el capítulo I y para obtener AC-Hly la técnica descripta en Ladant y col. (1986) (70). La cantidad de LPS obtenida se determinó mediante la cuantificación de 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato (KDO) tal como se describe más adelante. La cantidad de AC-Hly fue determinada por la técnica de Bradford (14) utilizando como patrón seroalbúmina bovina.

Para la obtención del suero policlonal anti-LPS se inocularon intraperitonealmente a 3 ratones BALB/c una cantidad de LPS equivalente a 800 ng de KDO homogeneizado previamente con igual volumen de adyuvante de Freund completo. Se repitieron las inmunizaciones por la misma vía a los 15 y 21 días con la mezcla de LPS y adyuvante de Freund incompleto. Luego de 7 días de la última inmunización se extrajo a blanco la sangre de los ratones y se obtuvo el suero. Éste último fue alicuotado y conservado hasta el momento de ser utilizado a -20°C . El mismo esquema de inmunización fue utilizado para la obtención del suero anti-AC-Hly utilizando en este caso 0,1 μg de la toxina en cada inoculación.

8.7. Determinación de KDO presente en los preparados de LPS. Para ello se utilizó la técnica descripta por Karkhanis *et al.* (1978) (62). Primeramente se mezclaron en un tubo polipropileno de 1,5 ml, 225 μl de muestra con 25 μl de H_2SO_4 2 N. Los tubos se calentaron a baño María durante 30 minutos. Luego se agregó 125 μl de H_5IO_6 0,04 M en H_2SO_4 0,125 N y la mezcla se agitó. Transcurridos 20 minutos a temperatura ambiente se agregó 125 μl de NaAsO_4 2,6% p/v en HCl 0,5 N, la mezcla se agitó vigorosamente hasta desaparición de la coloración marrón que se presenta en los primeros momentos del agregado. Luego, se agregaron 250 μl de ácido tiobarbitúrico 0,6 % p/v y la mezcla se calentó nuevamente a baño María durante 15 minutos. En caliente se agregaron 500 μl de dimetilsulfóxido y la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. La absorbancia se midió antes de los 30 minutos a 548 nm. La curva de calibración se realizó con un estándar de KDO y las concentraciones de KDO de las muestras fueron interpoladas de dicha curva.

8.8. Ensayos de adhesión e invasión en células epiteliales *in vitro*. Para la realización de estos ensayos se utilizaron células derivadas de epitelio pulmonar humano A549 (ATCC CCL185) y las cepas de *B. bronchiseptica* cultivadas previamente en medio líquido.

Las células de línea se cultivaron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (Laboratorios Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% p/v, estreptomycin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) hasta obtener un 70-80% de confluencia. Se sembraron placas de cultivo Nunclon Delta (Nunc, Roskilde, Denmark) de 24 lugares (well)

con aproximadamente $8 \cdot 10^4$ células por well 18 horas antes de cada ensayo. Para los ensayos de adhesión las células fueron sembradas sobre soportes de vidrio previamente dispuestos en los wells.

Los distintos mutantes ensayados y la cepa parental de *B. bronchiseptica* se cultivaron durante 12 horas a 37° C en frascos erlenmeyers agitados (160 rpm) conteniendo medio SS. Se suspendieron en el medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con SFB 10% p/v sin antibióticos hasta obtener una $DO_{650nm} = 0,5$.

Se agregaron a cada well $8 \cdot 10^6$ bacterias (proporción bacteria:células de 100:1) y se centrifugaron a 300 X g durante 5 minutos. Se incubaron 2 horas a 37° C y CO₂ 5% y las monocapas celulares fueron lavadas al menos cinco veces con PBS estéril.

i) Determinación del número de bacterias adheridas. Las células A549 crecidas sobre los vidrios fueron fijadas con metanol. Las mismas se tiñeron con cristal violeta (0,07 % p/v en agua) para ser cuantificadas mediante la observación en microscopio con contraste de fase con aumento 1000 X. El número de bacterias adheridas por célula se determinó examinando al menos 50 células epiteliales.

ii) Determinación de la supervivencia intracelular. Luego de la incubación de 2 horas de duración y de los lavados descriptos anteriormente, las células eucariotas distribuidas en monocapa fueron incubadas 3 horas a 37° C, CO₂ 5% para permitir la invasión bacteriana a las células. El medio fue entonces reemplazado por 0,5 ml de medio suplementado con polimixina B 100 µg ml⁻¹ y se incubaron durante 1 hora a 37° C, CO₂ 5% con el fin de eliminar las bacterias que no invadieron y se encontraban fuera de las células eucariotas. Luego de la incubación, la solución de polimixina B fue eliminada por lavados repetidos y reemplazada por medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con SFB 10% p/v, estreptomicina (100 µg ml⁻¹) y ampicilina (100 µg ml⁻¹). Las células que presentaban bacterias intracelulares se recuperaron tratando las monocapas con tripsina. El número de bacterias presentes se determinó mediante la siembra en SSs de las diluciones adecuadas. Con el fin de evaluar el número de células eucariotas viables, las mismas se tiñeron con el colorante vital Tripan blue. De esta manera se pudo calcular el número de UFC/célula eucariota.

Todos los experimentos que se han detallado fueron realizados al menos tres veces por duplicado. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los log₁₀ UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluados por un test de Student de dos colas con un grado de significación de $P < 0,05$.

9. Caracterización *in vivo* de los mutantes obtenidos

9.1. Ensayos de infección en animales. La cinética de colonización de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* fue evaluada empleando el modelo de infección murino. Para ello se emplearon ratones BALB/c hembras de 3 a 4 semanas de edad libres de patógenos provistos por el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UNLP. Para realizar las

inoculaciones, los animales se anestesiaron por inhalación de éter. Como inóculo para cada ratón se empleó 50 μ l de la suspensión bacteriana a ensayar ($5 \cdot 10^5$ UFC en PBS estéril, dosis subletal) proveniente de un cultivo líquido en fase logarítmica (Medio SS, 12 horas, 160 rpm, 37° C). El número de UFC a inocular se aproximó a través de medidas de absorbancia a 650 nm (1 unidad de $Abs_{650nm} = 3 \cdot 10^9$ UFC ml^{-1}). En ocasiones, tal como se describirá en Resultados se modificaron los valores de UFC o volúmenes utilizados a fin de conseguir situaciones particulares de infección.

Con el fin de determinar el número de bacterias que colonizaron los pulmones del animal, transcurridas 4 horas desde el momento de la inoculación y en distintos días, se sacrificaron por dislocación tres animales, a los cuales se les extrajo a través de técnicas quirúrgicas ambos pulmones. Estos se homogenizaron en 1,5 ml de PBS estéril con un homogeneizador con punta redonda de teflon de 0,966 pulgadas de diámetro (Cole Parmer) y a partir del homogenado se realizaron diluciones adecuadas para realizar el recuento de colonias en placas conteniendo SSs con los antibióticos adecuados según la cepa ensayada. Para el recuento de UFC las placas sembradas se incubaron a 37° C durante 48-72 horas.

Los animales utilizados fueron mantenidos en jaulas acondicionadas con viruta de madera estéril, la cual fue cambiada periódicamente y fueron alimentados con alimento balanceado estéril. Aquellos ratones a los que les fue inducida una neutropenia fueron mantenidos en cajas especiales de aislamiento, las cuales fueron abiertas cada vez que se requirió dentro del flujo laminar estéril. Durante este tipo de ensayos se realizaron recuentos del número de células de la serie blanca presentes en la sangre de los ratones. Para ello se utilizó la solución de Tuk (colorante vital azul de metileno y ácido acético al 5% v/v). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer al microscopio bajo aumento 500X.

En todos los ensayos realizados los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los \log_{10} UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluados por un test de Student de dos colas con un grado de significación de $P < 0,05$.

RESULTADOS

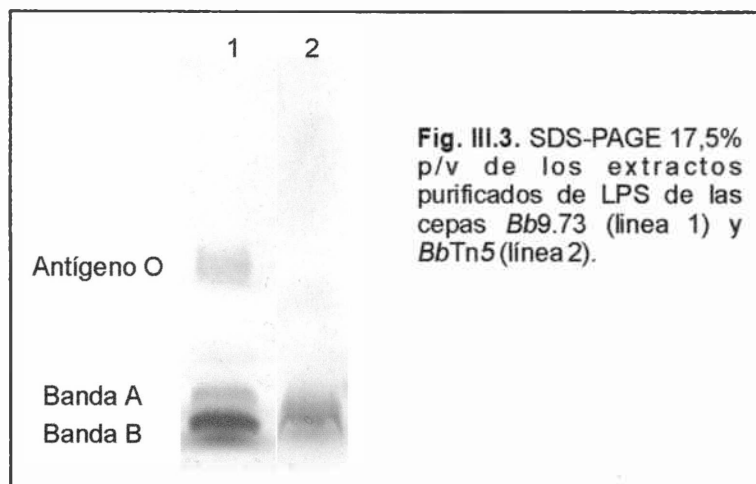
Obtención de mutantes de *B. bronchiseptica* que presenten una estructura del LPS similar a la observada en los aislamientos correspondientes al período crónico

Construcción de mutantes defectivos mediante mutagénesis al azar empleando al transposón Tn5. En el momento que comencé mi trabajo de tesis no se contaba con información molecular referida a la biosíntesis del LPS, es por ello que como primera estrategia para la obtención de mutantes que presentaran un fenotipo rugoso profundo similar al observado en las infecciones crónicas, decidimos realizar una mutagénesis al azar empleando al transposón Tn5. La transposición la realizamos empleando el vector suicida: el pSUP1021 (Km^r) que contiene en su secuencia al Tn5. Este vector fue transferido por conjugación a una cepa de *B. bronchiseptica* estreptomicina resistente (Sm^r) desde una cepa donadora *E. coli* S17-1 que contiene al vector. La selección de los transconjugantes se realizó mediante resistencia a antibióticos, en particular se seleccionaron colonias Km^r Sm^r (codificadas en la secuencia del transposón Tn5 y en el genoma de *Bordetella*, respectivamente). Sobre los transconjugantes Km^r-Sm^r obtenidos se analizó la sensibilidad a detergentes ya que es una de las características fenotípicas que fue descrita previamente para mutantes del LPS del tipo *deep rough* (108). La concentración del detergente a emplear se determinó de acuerdo a la sensibilidad de la cepa parental. Así para *B. bronchiseptica* CIP 9.73 la máxima cantidad de SDS que fue posible agregar al medio de cultivo SS agarizado fue de 0,02% p/v. Esta concentración de SDS se utilizó en todos los ensayos de selección que se describen en adelante.

Así se seleccionaron clones Km y Sm resistentes y SDS (0,02%) sensibles a los que denominamos *BbTn5* seguidos de un número. Con el fin de determinar el número de copias de Tn5 que se introdujeron en el cromosoma de *B. bronchiseptica* se empleó la técnica de Southern blot utilizando una sonda específica que hibrida sólo con secuencias del transposón. Para ello, primeramente se aisló el ADN de las cepas mutantes y de la salvaje, los cuales fueron tratados con la enzima de restricción EcoRI, enzima que reconoce un solo sitio a lo largo de toda la secuencia del transposón. Las muestras de ADN digeridas fueron sometidas a una corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8% p/v y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue expuesta a una sonda específica para el transposón Tn5 anteriormente marcada con digoxigenina. Se puede observar el reconocimiento de una única banda. Este resultado confirma la inserción del Tn5 en un único sitio. En base a estos resultados se seleccionó un mutante con el LPS alterado, resistente a Km y Sm al que denominamos *BbTn5*.

Con el fin de analizar si el perfil electroforético del LPS *BbTn5* se correspondía a un fenotipo rugoso profundo realizamos corridas en geles de poliacrilamida. Mediante esta técnica pudimos corroborar la presencia de una alteración en la estructura del LPS de este

mutante tal como se muestra en la figura III.3. A diferencia de la cepa parental *Bb9.73* que presenta un perfil característico de un fenotipo liso ya descrito por Di Fabio y colaboradores (32), el mutante *BbTn5* sólo presenta una única banda de igual movilidad que la banda B de la cepa parental. Si bien el mutante *BbTn5* presenta esta modificación en la estructura del LPS, la misma no se corresponde a un fenotipo rugoso profundo que era lo que se deseaba obtener.



Al igual que en los casos de los aislamientos provenientes de infecciones crónicas, el mutante *BbTn5* no presentó actividad hemolítica en el medio SSs. La ausencia de esta actividad podría deberse a que la mutación afecte la síntesis/secreción de esta toxina de la familia RTX como se ha descrito para otras bacterias Gram negativas (11). Sin embargo, antes de avanzar con los experimentos debíamos verificar que nuestro mutante no se hubiese construido sobre un clon avirulento espontáneo como consecuencia de un proceso de variación de fase irreversible. Este evento de variación irreversible ocurre con una frecuencia de 10^{-6} por lo que es posible observar la aparición de colonias avirulentas dentro de la población virulenta con relativa facilidad. Se analizó entonces si *BbTn5* presentaba el perfil proteico característico de alguna de las dos fases. Mediante la técnica de western blot se pudo determinar que *BbTn5* no expresa los marcadores de virulencia PRN, FHA y AC-Hly y sí expresa el marcador de avirulencia flagelina. Sucesivos cultivos a 37° C no permitieron revertir los perfiles proteicos observados, indicando que el proceso de variación observado fue irreversible.

Dado que las bacterias en fase avirulenta no son incapaces de infectar y establecerse en el hospedador (24, 25, 80) se decidió no realizar los ensayos *in vivo* de colonización y persistencia del mutante *BbTn5*.

Mediante análisis compartivos de la secuencia de la región interrumpida por el transposón Tn5 del mutante *BbTn5* con los datos del Genbank, pudimos determinar que la secuencia

problema presentaba una alta homología con genes que codifican para una metiltransferasa. Esta enzima estaría involucrada en varias rutas dentro del metabolismo bacteriano, no siendo exclusiva de la síntesis del LPS lo cual dificultaría la interpretación de los resultados. Es por ello que decidimos, con la información en este entonces disponible construir mutantes con una alteración profunda.

Construcción de mutantes defectivos mediante mutagénesis insercional sitio específica

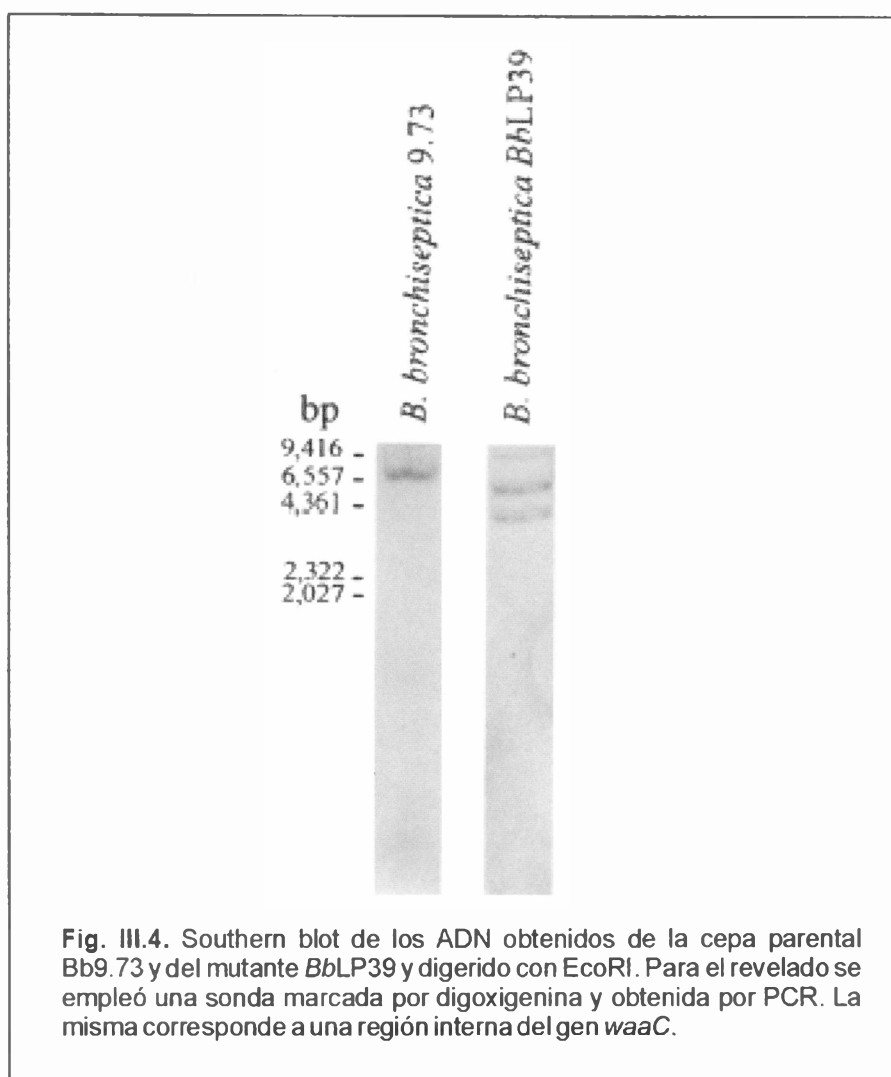
Gracias a que se identificaron y secuenciaron varios de los genes involucrados en la biosíntesis del LPS (1) en esta segunda etapa decidimos construir mutantes por inserción sitio específica.

En particular, en base a secuencias previamente descritas del gen *waaC* que codifica para una heptosiltransferasa que interviene en la biosíntesis del core interno del LPS (108), diseñamos secuencias oligonucleotídicas que permitirían amplificar una región interna del mismo gen en *B. bronchiseptica*. Se amplificó así una porción interna de 200 pares de bases (pb) del gen *waaC* de *Bb9.73*. Dicho fragmento fue clonado en un vector no replicativo en *Bordetella* (pK18mob::*waaC* interno) y secuenciado, dando un 97% de identidad con el cósmido *BbLPS1* de *B. bronchiseptica* (AJ007747), 97% con el mismo gen de *B. pertussis* (X90711) y 54% de identidad con la correspondiente heptosiltransferasa I de *E. coli* (AF019476).

El plásmido recombinante pK18mob::*waaC*, movilizable y suicida en *B. bronchiseptica*, fue introducido desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 a la receptora *Bb9.73* por conjugación. Los transconjugantes fueron seleccionados mediante la resistencia a los antibióticos estreptomicina (Sm) por la cepa receptora y kanamicina (Km) por el plásmido integrado. A partir de las colonias Sm^rKm^r se seleccionó un mutante rugoso profundo de acuerdo a la sensibilidad a SDS 0,02% p/v de aquí en más denominado *BbLP39*.

A fin de determinar si el evento de recombinación se produjo en un solo sitio del cromosoma de *B. bronchiseptica* y sobre el lugar pretendido, se realizó un blotting utilizando la técnica descrita por Chomczynski (21). En primer lugar, el ADN de las cepas mutantes y de la salvaje fueron digeridos con *EcoRI*, enzima que reconoce un único sitio a lo largo de toda la secuencia del vector pK18mob. Luego, las muestras digeridas fueron sometidas a una corrida electroforética y a una transferencia hacia una membrana de nitrocelulosa para ser revelada con una sonda, específica para el fragmento interno del gen *waaC* marcada con digoxigenina. En la figura III.4 donde se muestra el resultado del Southern blot se puede observar que la sonda mencionada hibrida con una única banda en la cepa salvaje mientras que en *BbLP39* se observan dos bandas de menor tamaño. Como se esperaba, la suma de los tamaños de estas dos bandas (4,2 Kpb y 6,3 Kpb) da como resultado el tamaño de la única banda presente en la cepa salvaje (6,8 Kpb) más 3,7 Kpb correspondientes al vector utilizado (pK18mob). Este resultado confirma que estamos frente a un único inserto de

nuestro vector y que se encuentra en el gen *waaC*, tal como se deseaba. Este mutante al que denominamos *BbLP39*, fue repicado y conservado a -80°C tal como se describe en materiales y métodos para ser utilizado en los diferentes ensayos que se detallan a lo largo de esta Tesis.



Análisis de la estructura del LPS del mutante de cepa *B. bronchiseptica*, *BbLP39* mediante corridas electroforéticas. Teniendo en cuenta que el gen interrumpido *waaC* codifica para la heptosiltransferasa necesaria para la adición de la primera heptosa al lípido A-KDO (Fig. III.1) (1) es esperable que la mutación en dicho gen conduzca a un fenotipo del LPS del tipo rugoso profundo (28, 68, 108). Con el fin de analizar el perfil del LPS del mutante *BbLP39* realizamos corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida conteniendo SDS. Como se observa en la figura III.5, mientras que la cepa parental *Bb9.73* presenta las bandas características del LPS descritas para esta especie (32), el LPS de *BbLP39* posee una única banda de mayor movilidad electroforética respecto a todas las presentes en la cepa parental.

Este patrón de corrida electroforético es consistente con el fenotipo rugoso profundo descrito para otras bacterias Gram negativas (99, 108).

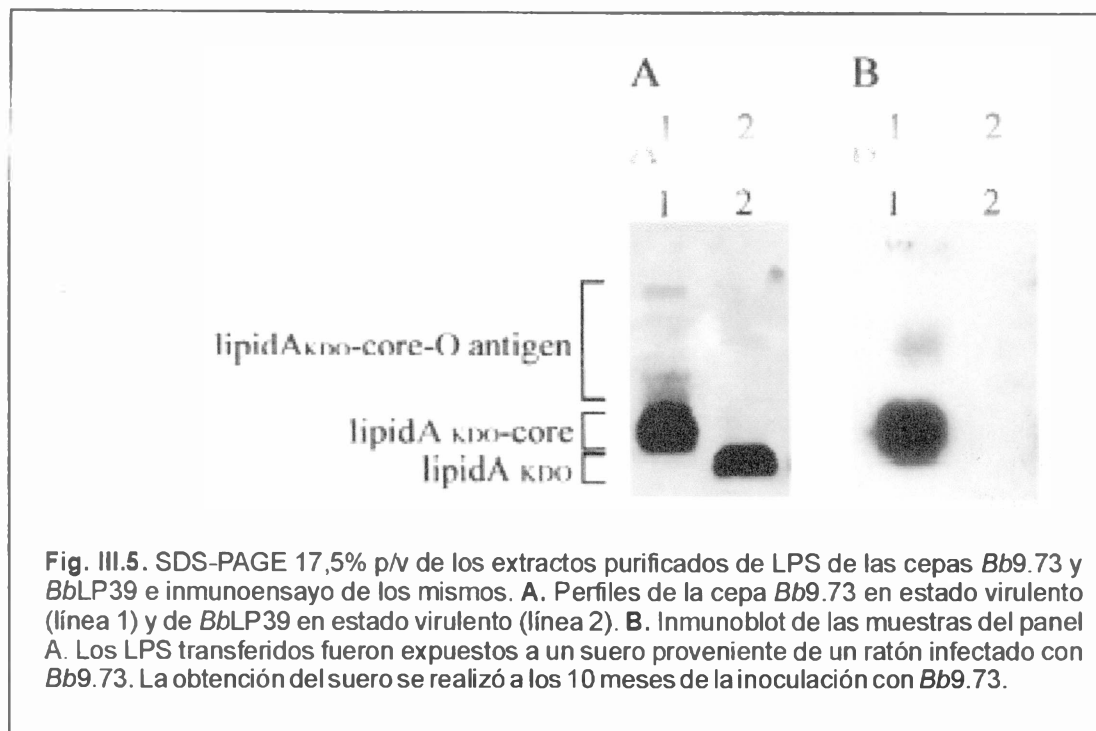
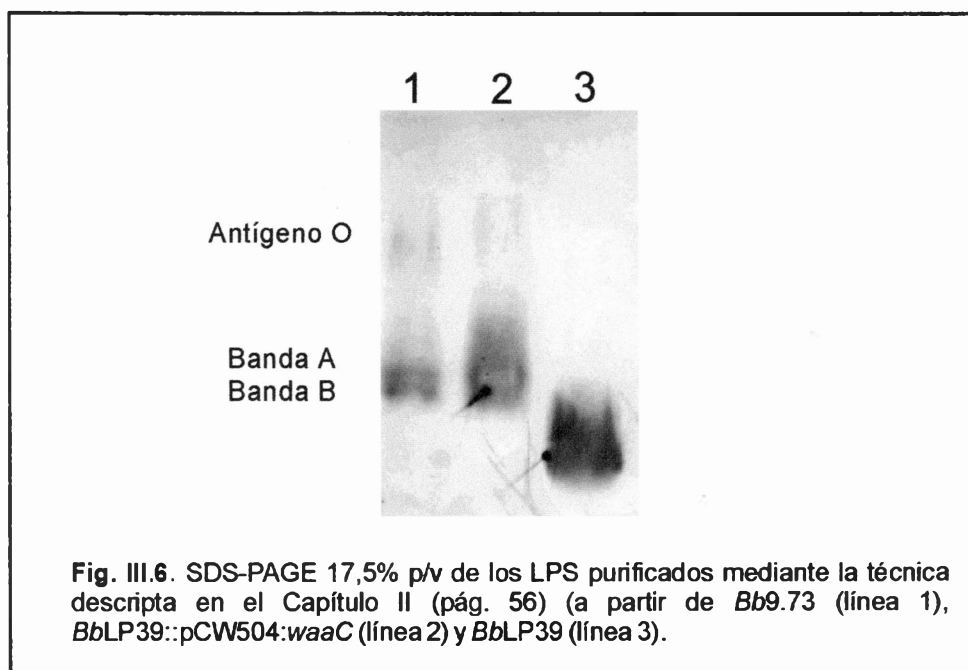


Fig. III.5. SDS-PAGE 17,5% p/v de los extractos purificados de LPS de las cepas *Bb9.73* y *BbLP39* e inmunoensayo de los mismos. A. Perfiles de la cepa *Bb9.73* en estado virulento (línea 1) y de *BbLP39* en estado virulento (línea 2). B. Inmunoblot de las muestras del panel A. Los LPS transferidos fueron expuestos a un suero proveniente de un ratón infectado con *Bb9.73*. La obtención del suero se realizó a los 10 meses de la inoculación con *Bb9.73*.

Reactividad del LPS de la cepa *BbLP39* frente a sueros. Los aislamientos de *B. bronchiseptica*, provenientes de infecciones crónicas, presentan como ya se ha discutido más arriba, un LPS trunco o rugoso profundo en principio similar al obtenido por nosotros. La estructura del LPS presente en los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos durante la infección crónica no es reconocida por sueros obtenidos del paciente infectado (trabajo realizado por Dra. Hozbor en colaboración con el Instituto Pasteur, París). Es en base a este resultado que decidimos analizar la actividad inmunológica del LPS de *BbLP39* frente a un suero proveniente de un ratón infectado con *Bb9.73*. Cuando se llevaron a cabo inmunoensayos a través de la técnica de western blot, el suero proveniente de un ratón infectado con la cepa parental *Bb9.73* reconoció todas las formas presentadas por el LPS completo, sin embargo no pudo reconocer al LPS rugoso profundo de *BbLP39* en las condiciones utilizadas en nuestro laboratorio (Fig. III.5).

Complementación del fenotipo rugoso profundo presente en *BbLP39*. Para confirmar que los cambios fenotípicos observados en *BbLP39* se debían en forma exclusiva a la construcción realizada por nosotros y no por algún otro efecto no controlado, se realizó una complementación en *trans* empleando una biblioteca genómica a partir del ADN de *Bb9.73*. Este ADN fue digerido en forma parcial con las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI*. Los fragmentos así obtenidos se insertaron en el vector pCW504 replicativo en *B. bronchiseptica* (129). Los plásmidos recombinantes luego fueron transferidos desde una cepa donadora *E. coli* S17-1 hacia la cepa receptora *BbLP39*. Los transconjugantes fueron seleccionados por

resistencia a antibióticos y por resistencia al SDS. A partir de una cepa resistente a los antibióticos y a la presencia de SDS pudimos aislar un plásmido que contenía un fragmento de 5.9 kpb capaz de complementar el fenotipo rugoso profundo (Fig. III.6). Además, utilizando como molde a este plásmido pudimos amplificar por PCR un fragmento del tamaño esperado (1529 pb) con los primers *totalwaaC* y *totalwaaC*, específicos para reconocer al gen *waaC*, indicando la presencia de este gen en el fragmento clonado.

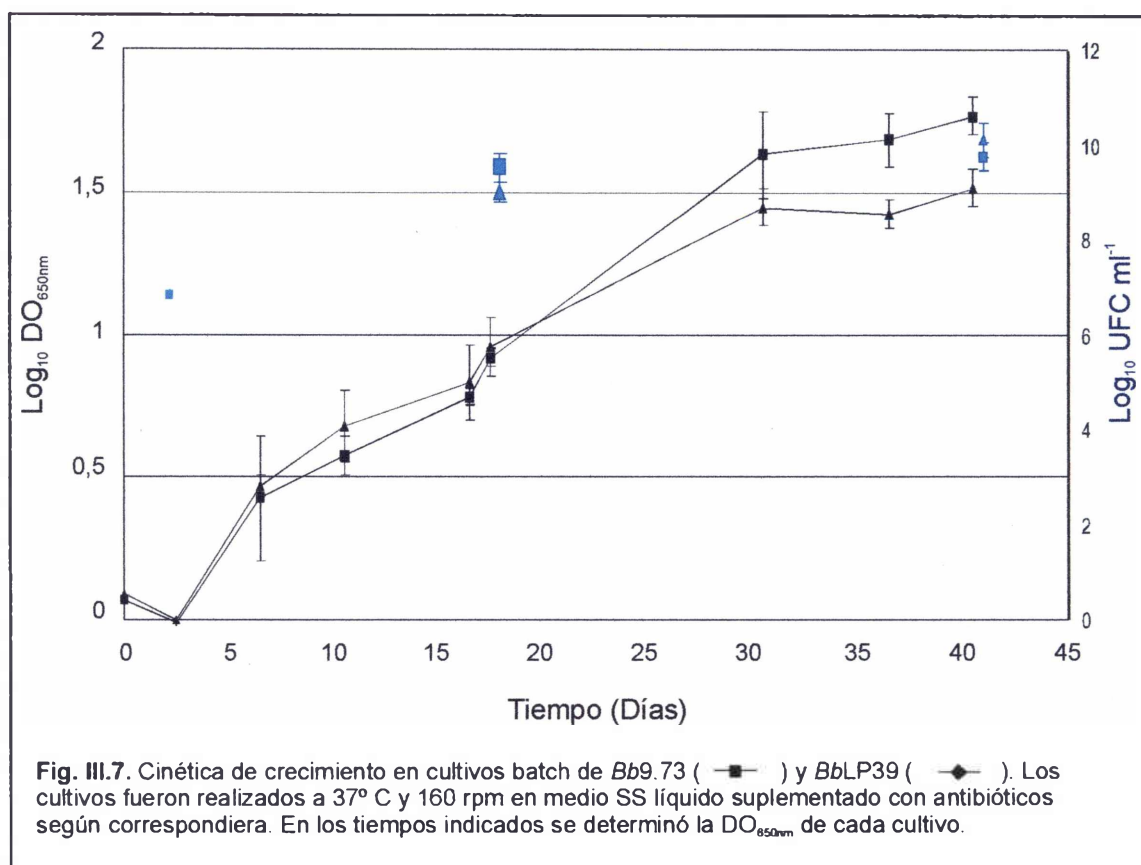


Caracterización fenotípica *in vitro* del mutante defectivo *BbLP39*

El objetivo de la construcción de este mutante fue poder determinar de qué manera la presencia de un LPS trunco participa en el establecimiento de un proceso crónico de infección. Con el fin de comprobar que no se encuentren otras alteraciones que impidan la correcta interpretación de los resultados evaluamos, en primer lugar, la cinética de crecimiento *in vitro* de *BbLP39*. Luego se caracterizó la expresión proteica de este mutante haciendo hincapié en aquellas proteínas que han sido descritas como imprescindibles para el establecimiento de la infección. Finalmente también observamos si la modulación a través del sistema de dos componentes se encontraba funcional a fin de garantizar una correcta expresión de los genes *vag* y *vrg* durante la infección.

Caracterización del crecimiento *in vitro* de *BbLP39*. Se analizó el desarrollo del mutante en frascos erlenmeyers utilizando el medio sintético de Stainer Scholte, ya descrito como óptimo para cultivo de este microorganismo. Los frascos se inocularon con una suspensión bacteriana de forma de alcanzar una densidad óptica a 650 nm de 0,2, y a partir

de ahí a distintos tiempos fueron tomadas alícuotas de forma de ir registrando a lo largo del tiempo valores de densidad óptica y número de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos obtenidos en comparación con la cepa parental se muestran en la figura III.7. Como puede observarse, la cepa mutante *BbLP39* presenta una cinética de crecimiento similar a la de la cepa parental, alcanzando ambas un número máximo de aprox. 8×10^9 UFC/ml con una velocidad de crecimiento de aproximadamente $0,24 \text{ h}^{-1}$.



Análisis del perfil de proteínas de membrana externa presentes en *BbLP39*. Con el fin de analizar si la mutación en el LPS conduce además a una modificación en la expresión de las proteínas de membrana externa (OMP) tal como se ha descrito en otros mutantes *deep rough* (89) realizamos corridas electroforéticas en geles de poliácridamida de muestras obtenidas de la cepa parental y las del mutante *BbLP39*. Las preparaciones enriquecidas en OMP fueron obtenidas de ambas cepas empleando la técnica descrita por Schnaitman *et al* (1970) (109) basada en la diferencia de solubilidad en detergente de las proteínas de membrana externa y las de la membrana citoplasmática. Las muestras así obtenidas fueron sometidas a corridas electroforéticas en geles de poliácridamida conteniendo SDS. Como puede observarse en la figura III.8 los perfiles obtenidos para ambas cepas resultaron ser similares cuali o cuantitativamente entre sí y similares también a los previamente descritos para *Bordetella* (121).

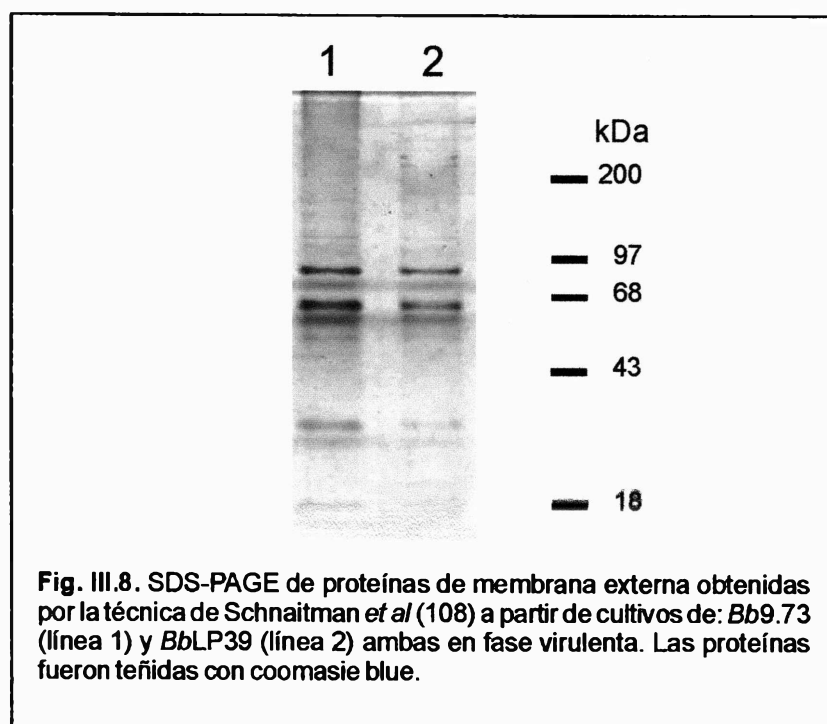
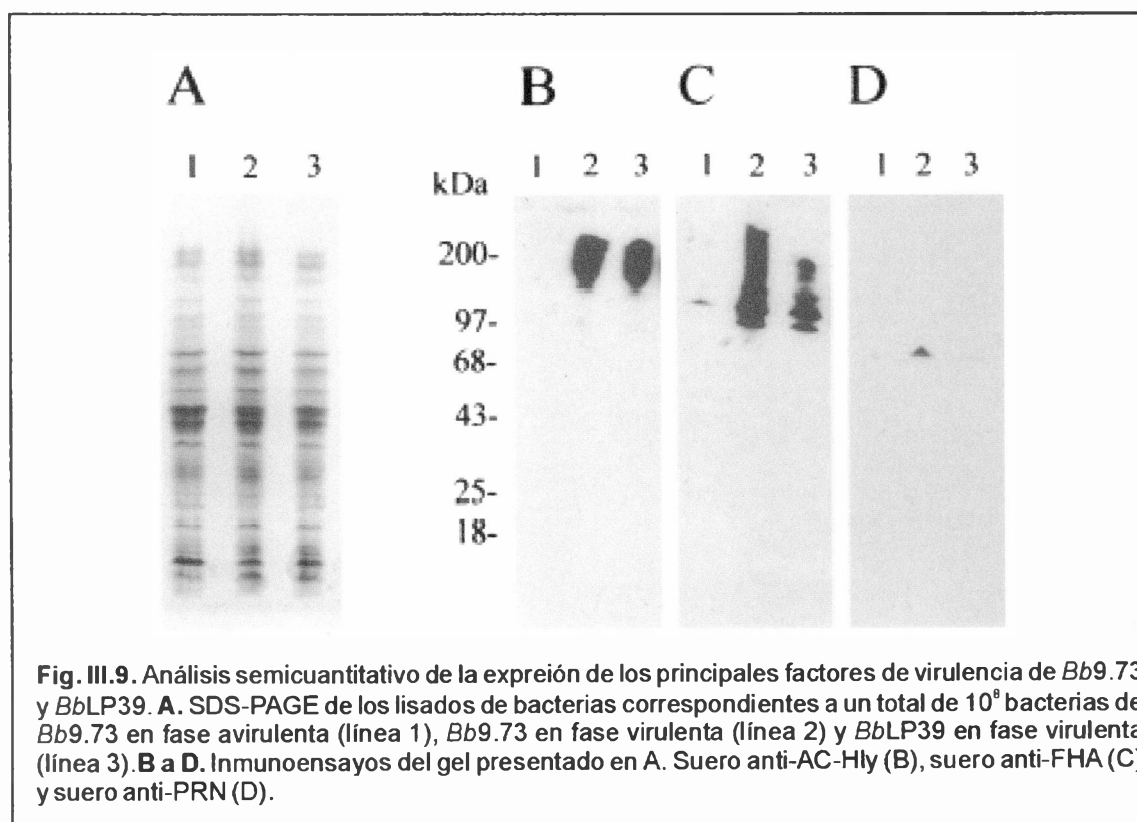


Fig. III.8. SDS-PAGE de proteínas de membrana externa obtenidas por la técnica de Schnaitman *et al* (108) a partir de cultivos de: *Bb9.73* (línea 1) y *BbLP39* (línea 2) ambas en fase virulenta. Las proteínas fueron teñidas con coomasie blue.

Análisis de la modulación de fase de *BbLP39*. Con el fin de avanzar en la caracterización de *BbLP39*, se estudió la funcionalidad del sistema BvgAS. La proteína BvgS de este sistema se encuentra en la membrana citoplasmática de la bacteria sensando los cambios que se producen en el medio exterior y regulando a través de BvgA la expresión de varios factores de virulencia de la bacteria (20, 66, 133). Las modificaciones presentes en el LPS de *BbLP39* podrían afectar la transducción de señales de este sistema por estar en parte contenido en la superficie de la bacteria. Por lo tanto se analizó la funcionalidad del sistema BvgAS a través de la evaluación de la respuesta de *BbLP39* frente a la presencia de moduladores conocidos. Se sometieron así a las cepas *Bb9.73* y *BbLP39* a distintas condiciones moduladoras: a) crecimiento a 22° C y b) en presencia de sulfato de magnesio 40 mM. Pasado un período de incubación de 24 hs se procedió a analizar la expresión de la actividad hemolítica debida a AC-Hly como marcador de virulencia a través de la observación del halo de hemólisis en placas de Petri conteniendo el medio SS suplementado con sangre. A través de estos ensayos se pudo establecer que ambas cepas responden normalmente a la presencia de los moduladores no expresando actividad hemolítica en condiciones de cultivo avirulento. También se pudo observar que en condiciones de cultivo virulento, es decir en ausencia de los moduladores, ambas cepas presentaban un halo de hemólisis de similar diámetro.

Análisis de la expresión de los principales factores de virulencia de *BbLP39* (AC-Hly, FHA y PRN). En la bibliografía se encuentran datos sobre mutantes en otras bacterias Gram negativas que presentan un fenotipo del LPS del tipo rugoso profundo con alteraciones a nivel de la expresión de ciertas proteínas, en particular las que pertenecen a la familia de toxinas denominadas RTX (por repetición en toxina) o se encuentran en la membrana externa de la bacteria (11, 91, 118, 126). Es en este marco teórico que decidimos analizar para *BbLP39* el nivel de expresión de los factores de virulencia previamente caracterizados como AC-Hly, perteneciente a la familia de toxinas RTX, y PRN y FHA, presentes ambas en la membrana externa de la bacteria. Para ello realizamos un análisis semicuantitativo de la expresión de los determinantes de virulencia mediante el empleo de la técnica de inmunoblot usando antisueros específicos policlonales anti-AC-Hly, anti-Prn y anti-FHA. Los inmunoblots se realizaron a partir de proteínas totales obtenidas de lisados bacterianos de la cepa mutante y de la parental. Como se muestra en la figura III.9, los diferentes sueros policlonales específicos para los factores de virulencia analizados permitieron detectar la presencia de AC-Hly, PRN y FHA en *Bb9.73* y *BbLP39* cultivadas en condiciones de virulencia. Sin embargo, para *BbLP39* se pudo observar una disminución de la expresión de



ambas adhesinas siendo más pronunciada la correspondiente a PRN. El nivel presentado para AC-Hly fue indistinguible entre ambas cepas.

Construcción de un mutante de *B. bronchiseptica* defectivo en la expresión del gen *cyaA*. Como hemos mencionado anteriormente, modificaciones en la estructura del LPS pueden ocasionar modificaciones en la expresión de diferentes proteínas, en general presentes en la membrana externa de la bacteria. Este fenómeno no es exclusivo del género *Bordetella* y ha sido descrito en otras bacterias Gram negativas (11, 33, 69, 89, 91, 113, 114, 136).

A lo largo del proceso infeccioso crónico de *B. bronchiseptica* la toxina AC-Hly y el LPS sufren cambios en su expresión y en su estructura respectivamente (48). Teniendo en cuenta los antecedentes que relacionan a estos dos componentes, es posible suponer que los cambios observados *in vivo* podrían encontrarse relacionados entre sí. Sin embargo el mutante BbLP39 construido por nosotros como hemos demostrado más arriba, no presenta disminución en la expresión de AC-Hly. Con el fin de analizar la relación inversa, es decir si la vía de biosíntesis de AC-Hly altera el fenotipo del LPS se procedió a construir un mutante insercional sobre el gen *cyaA*, que codifica la toxina. Con tal fin se clonó un fragmento interno del gen *cyaA* en un vector movilizable y suicida en *Bordetella*. Este plásmido recombinante fue transferido a *B. bronchiseptica* 9.73 por conjugación y los transconjugantes fueron seleccionados de acuerdo a la resistencia codificada en el cromosoma de la cepa receptora y la del plásmido integrado en el genoma a través de un único evento de recombinación homóloga. Los transconjugantes resistentes a los antibióticos estreptomicina (resistencia codificada en el genoma de la cepa parental) y kanamicina (resistencia obtenida por la presencia del vector insertado) fueron entonces evaluados en cuanto a la expresión de la AC-Hly a través de ensayos de hemólisis en el medio SSs y western blot empleando un antisuero específico anti-AC-Hly. Se seleccionó así una cepa Sm^r , Km^r y AC-Hly^- que denominamos *Bbcya*⁻. Para verificar que las colonias no hemolíticas (Hly^-) seleccionadas no fueran variantes de fase avirulenta ya que la expresión de AC-Hly está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS (46, 72, 101), se evaluó la expresión de marcadores de avirulencia. En particular se evaluó la presencia de flagelo a través de ensayos de movilidad (este fenotipo de aquí en más lo abreviaremos como Mov) en paralelo con la expresión de un factor de virulencia la adhesina FHA también regulada por el sistema BvgAS. Efectivamente pudimos verificar que nuestra construcción se encontraba sobre una variante virulenta que era lo buscado ya que la colonia seleccionada era Mov^- y expresaba el factor de virulencia FHA.

El análisis genómico de la construcción hecha en *Bbcya*⁻ se realizó a través de Southern blot empleando una sonda específica marcada con digoxigenina (Fig. III.10). Los resultados obtenidos confirman la correcta inserción del plásmido recombinante en el gen *cyaA* causando que la toxina AC-Hly no se exprese (Fig. III.11).

Con el fin de observar si las alteraciones sobre el gen *cyaA* inducen cambios sobre la estructura del LPS se purificó esta molécula a partir de cultivos de *Bbcya*⁻ a 37°C. El LPS presente en esta cepa (Fig. III.12) presenta las bandas características de la especie, es decir

las bandas A y B de mayor movilidad junto a una banda de tamaño heterogéneo de menor movilidad correspondiente al LPS completo (lípidido A- core-trisacárido-antígeno O).



Fig. III.10. Southern blot de ADN genómico digerido con EcoRI de *Bb*9.73 (línea 1) y *BbcyaA*⁻ (línea 2). Se utilizó como sonda el fragmento interno amplificado con UTP marcada con digoxigenina.

Ni la movilidad de las bandas ni la cantidad relativa de ninguna de ellas presentaron diferencias respecto de los del LPS proveniente de la cepa parental cultivada en las mismas condiciones.

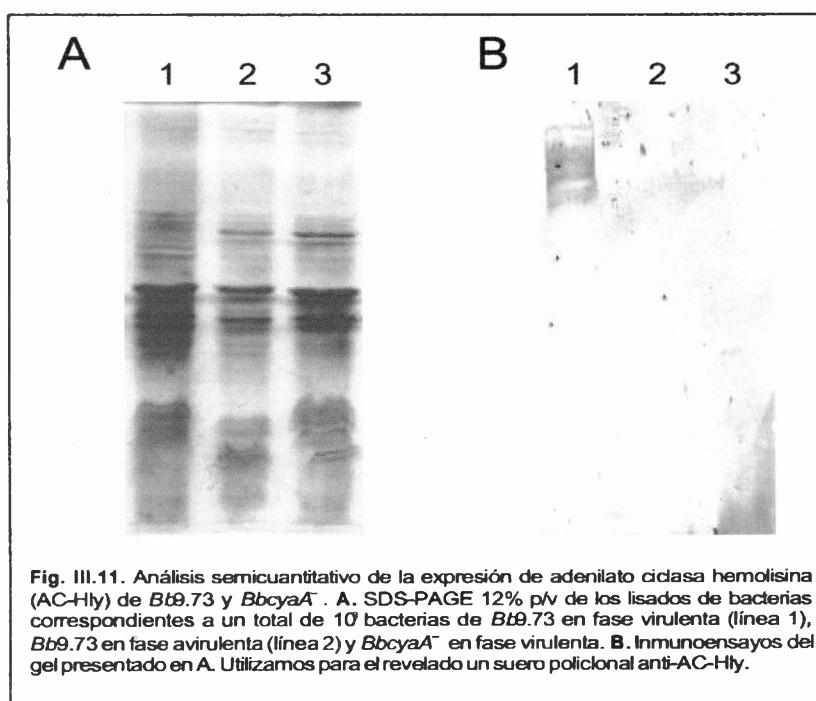
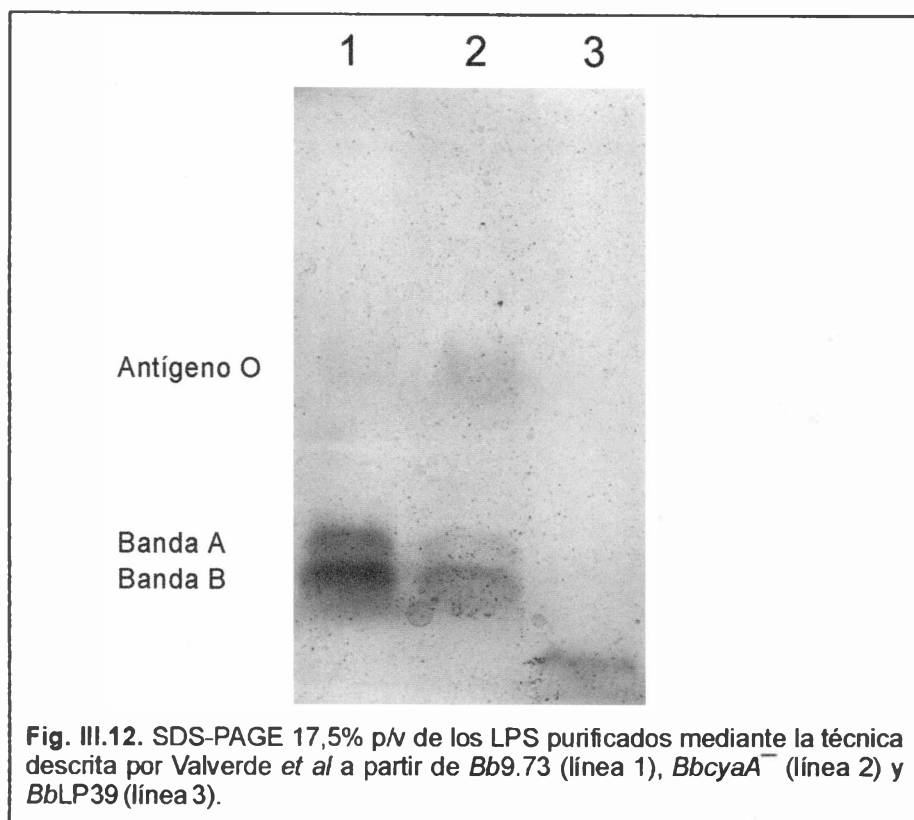


Fig. III.11. Análisis semicuantitativo de la expresión de adenilato ciclasa hemolisina (AC-Hly) de *Bt*9.73 y *BbcyaA*⁻. **A.** SDS-PAGE 12% p/v de los lisados de bacterias correspondientes a un total de 10⁷ bacterias de *Bt*9.73 en fase virulenta (línea 1), *Bt*9.73 en fase avirulenta (línea 2) y *BbcyaA*⁻ en fase virulenta. **B.** Inmunoensayos del gel presentado en A. Utilizamos para el revelado un suero policlonal anti-AC-Hly.



Caracterización fenotípica *in vivo* de mutante defectivo *Bb*LP39.

Cinética de infección de *Bb*LP39 empleando el modelo de infección intranasal en ratones. Con el objetivo de analizar si los cambios en la expresión de proteínas y la aparición de un fenotipo rugoso profundo del LPS observados durante el desarrollo de un proceso infectivo (48, 49) se corresponden con un mecanismo de evasión desarrollado por la bacteria en respuesta a la defensa montada por el hospedador, hemos diseñado una serie de experimentos de infección en ratones teniendo en cuenta la cinética de aparición de respuesta inmune en el hospedador. Se ha descrito que entre los 25 y 40 días posinfección es posible detectar la presencia de anticuerpos específicos contra PRN, FHA, AC-Hly y el LPS (84). Luego de este tiempo post-inoculación cuando se esperaría que la bacteria cambie de perfil proteico y de estructura del LPS a fin de persistir dentro del hospedador. Nuestros ensayos consistieron entonces en realizar una primera infección con la cepa parental siguiendo un protocolo clásico de infección en ratones luego, realizar una segunda infección en el momento que hubiera respuesta inmune específica. Cierta tiempo después de la segunda infección procedería al aislamiento de las colonias que hubieran superado la respuesta inmune montada después de la primera infección. Sin embargo, esta situación no pudo ser evaluada ya que no se pudieron aislar colonias quizás como consecuencia de la

respuesta inmune presente en el momento de la segunda inoculación. Por lo tanto, estos ensayos no permitieron simular la situación presente a lo largo de una infección crónica.

Con el fin de lograr colonización en la segunda infección decidimos realizar el experimento descrito anteriormente pero inoculando la segunda vez con bacterias que presentaban un fenotipo de superficie rugoso profundo diferente al de las bacterias inoculadas primeramente (cepa parental). La segunda inoculación se realizó a los 34 días después de la primera inoculación ya que en ese momento la respuesta inmune del hospedador habría comenzado a desarrollarse. El experimento consistió entonces, en inocular grupos de ratones con la cepa parental en dosis subletales, estos ratones fueron divididos en dos grupos y a una mitad de la población de ratones se le inocularon por vía intranasal alrededor de $5 \cdot 10^4$ bacterias de la cepa *BbLP39* (Km^r y Sm^r) y al resto la misma cantidad de la cepa parental pero marcada con la proteína fluorescente verde GFP y Km (*BbGFP* Km^r y Sm^r). Esta última bacteria no presenta diferencias respecto a la cepa parental en cuanto a la cinética de infección en un modelo murino de infección simple (Fig. III.13). Este número de bacterias que se inocularon por segunda vez correspondía a la cantidad de bacterias que se recuperarían del pulmón de un ratón infectado con la cepa parental a los 34 días post infección.

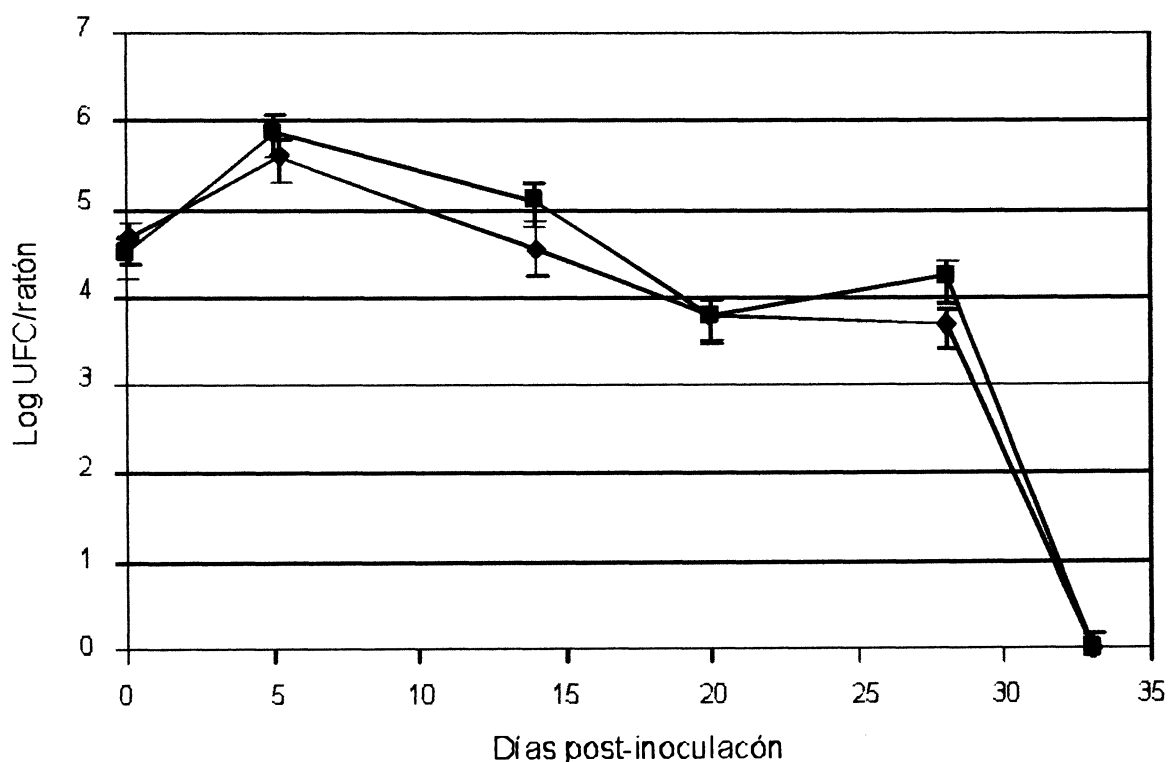


Fig. III.13. Ensayos de infección de *B. bronchiseptica* *in vivo*. Ratones BALB/c hembras de 3 semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal con 50 μ l con aprox. $5 \cdot 10^4$ de *Bb9.73* (■) o *BbGFP* (▲), ambas en fase virulenta. En los días posteriores al momento de la inoculación indicados, los ratones fueron sacrificados. A partir de cada ratón se extrajeron los pulmones los cuales fueron homogenizados, diluidos y plaqueados adecuadamente para realizar el recuento de bacterias. Los valores representan el promedio obtenido de tres ratones en cada punto.

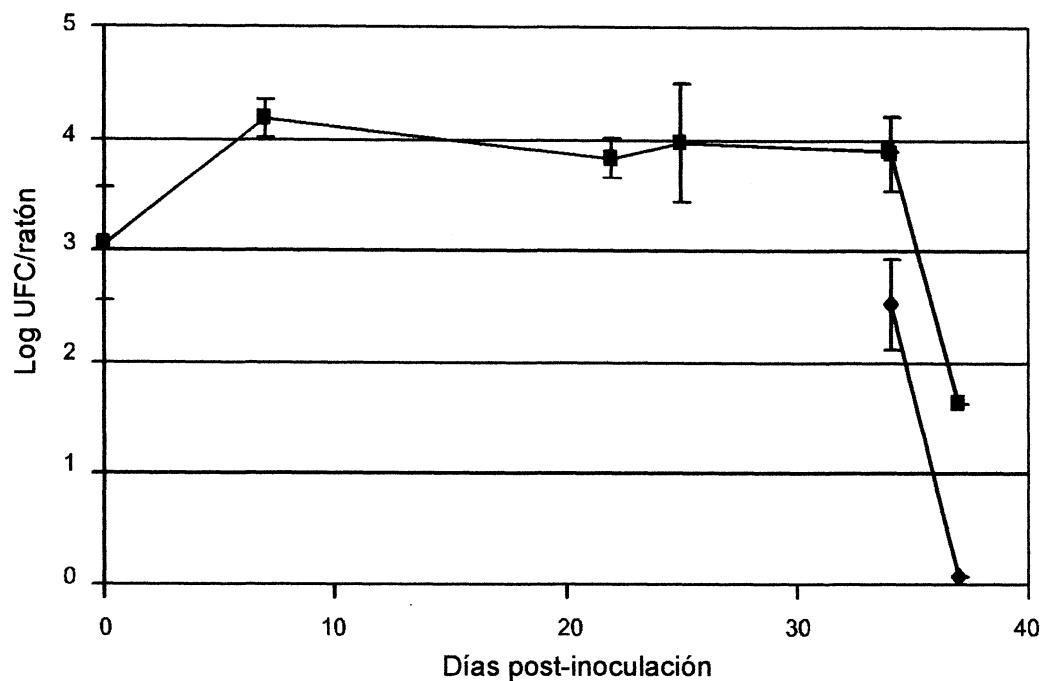
Transcurridas 4 y 72 horas desde el momento de la reinoculación se realizaron los recuentos de las bacterias en los pulmones de los ratones infectados. Los resultados obtenidos mostraron que a las cuatro horas post inoculación se recuperaron colonias tanto de los pulmones obtenidos los ratones infectados con la cepa parental marcada con el plásmido pBG51 como los de los ratones infectados con la cepa mutante *BbLP39*. A las 72 horas post-inoculación, sin embargo, no fue posible observar colonias en ninguno de los dos casos (Fig. III.14). Acompañando este descenso en el número de bacterias viables a las cuatro horas postinoculación se pudo observar una caída significativa en el número de la cepa parental *Bb9.73* inoculada en la primera infección respecto al presente en el momento de la reinoculación (tiempo cero de la segunda inoculación) (Fig. III.14).

En base a estos resultados y con el fin de evitar la presencia de la respuesta inmune contra la bacteria ya presente a los 35 días postinfección, se decidió repetir el procedimiento anterior reinoculando 5 días después de la primera infección. En esta etapa de la infección, sólo se encuentra presente la respuesta innata y aún no es posible detectar la presencia de una respuesta humoral contra la infección. Nuevamente, transcurridas 72 horas no se recuperaron bacterias de la cepa *BbLP39* de los pulmones de los animales sacrificados (Fig. III.15). Sin embargo, en esta oportunidad, la cepa *BbGFP* fue capaz de sobrevivir en el animal por un tiempo más prolongado, con una cinética de eliminación similar a la de la cepa inoculada originalmente (Fig. III.15).

Los resultados anteriores parecieran indicar que la *BbLP39* presenta dificultades en iniciar el proceso infectivo como producto de la propia mutación presente en el gen *waaC*. Con el fin de analizar este aspecto evaluamos en forma comparativa con la cepa parental la cinética de infección de *BbLP39* en ratones BALB/c a través de un ensayo clásico de infección. Inoculamos ratones por vía intranasal con dosis subletales la cepa *BbLP39* ($5 \cdot 10^5$ UFC en 50 μ l de PBS) y analizamos a distintos días el progreso de la infección mediante recuento de colonias en los pulmones del ratón infectado (Fig. III.16). Para ello a cada tiempo postinfección se sacrificaron ratones a los que se les extrajeron ambos pulmones y se plaquearon diluciones adecuadas de los homogenados en placas SSs de forma de poder realizar el recuento de colonias. La cepa parental *Bb9.73* presentó el perfil clásico de infección (47) consistente en un aumento en el número de colonias durante los primeros diez días para luego comenzar a descender lentamente, pudiéndose obtener algunas pocas colonias transcurridos 40 días postinfección. Sin embargo, en el caso de la infección con la cepa *BbLP39* a 72 horas después del momento de la inoculación no fue posible observar la presencia de colonias en los pulmones de los ratones infectados.

Esta deficiencia observada en el inicio de la infección imposibilitó realizar el análisis de la importancia de la presencia del LPS trunco en un proceso crónico, ya que el proceso infeccioso en sí no logra iniciarse. Para verificar si realmente *BbLP39* presentaba alguna alteración en las primeras etapas de la infección realizamos ensayos de adhesión *in vitro*.

A



B

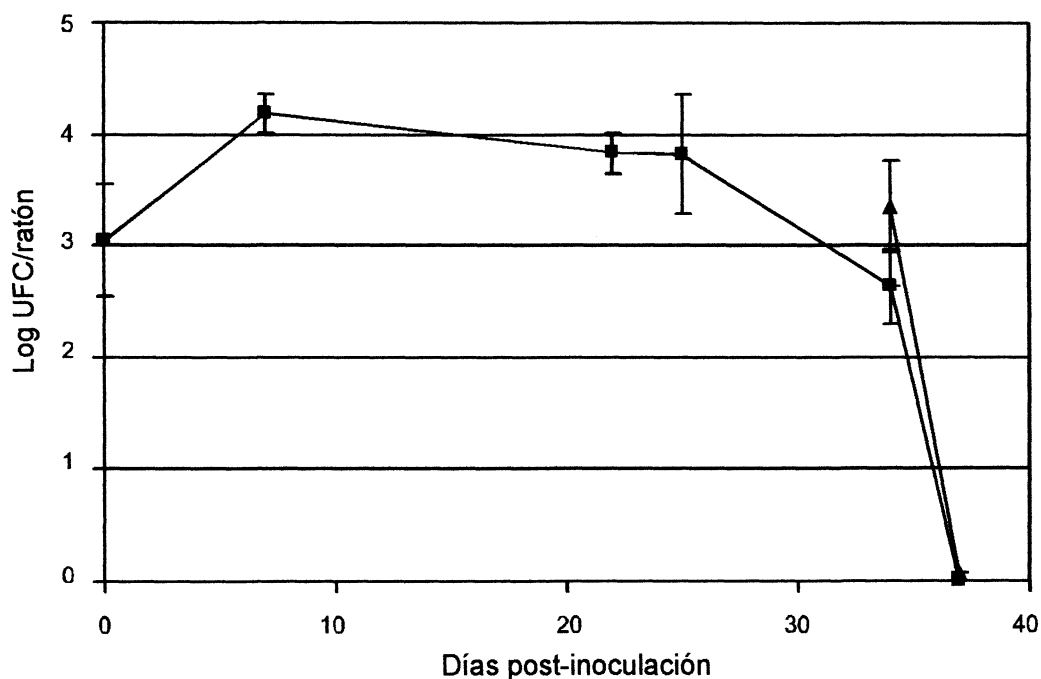


Fig. III.14. Ensayos de infección de *B. bronchiseptica* *in vivo*. Ratones BALB/c hembras de 3 semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal con 50 μ l con aprox. 5×10^5 de *Bb*9.73 en fase virulenta. Transcurridos 34 días la mitad de los animales se reinocularon con (A) 5×10^4 bacterias *Bb*GFP (—◆—) o (B) 5×10^4 bacterias *Bb*LP39 (—■—). En los días posteriores al momento de la inoculación indicados los ratones fueron sacrificados. A partir de cada ratón se extrajeron los pulmones los cuales fueron homogenizados, diluidos y plaqueados adecuadamente para realizar el recuento de bacterias. Los valores representan el promedio obtenido de tres ratones en cada punto.

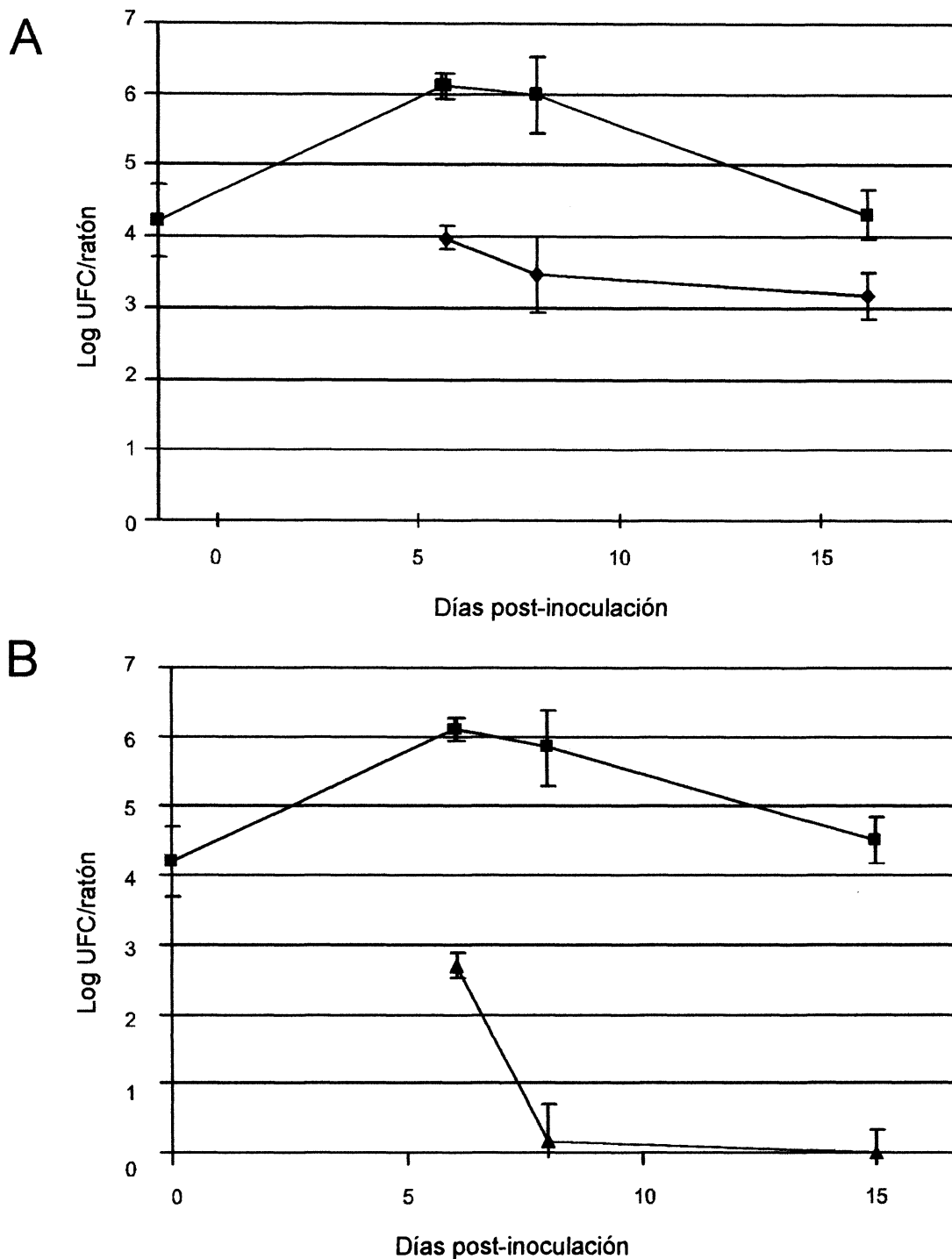
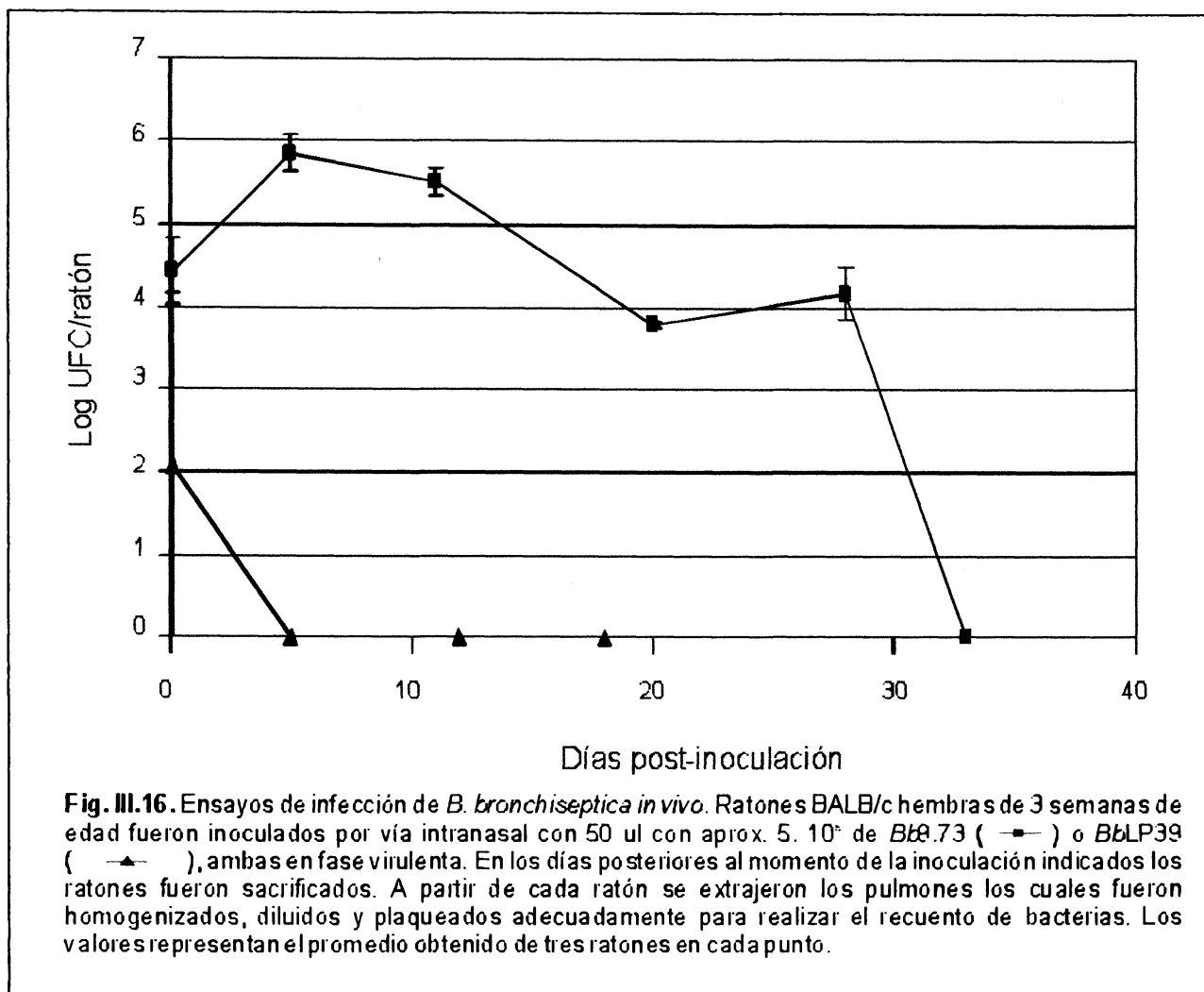


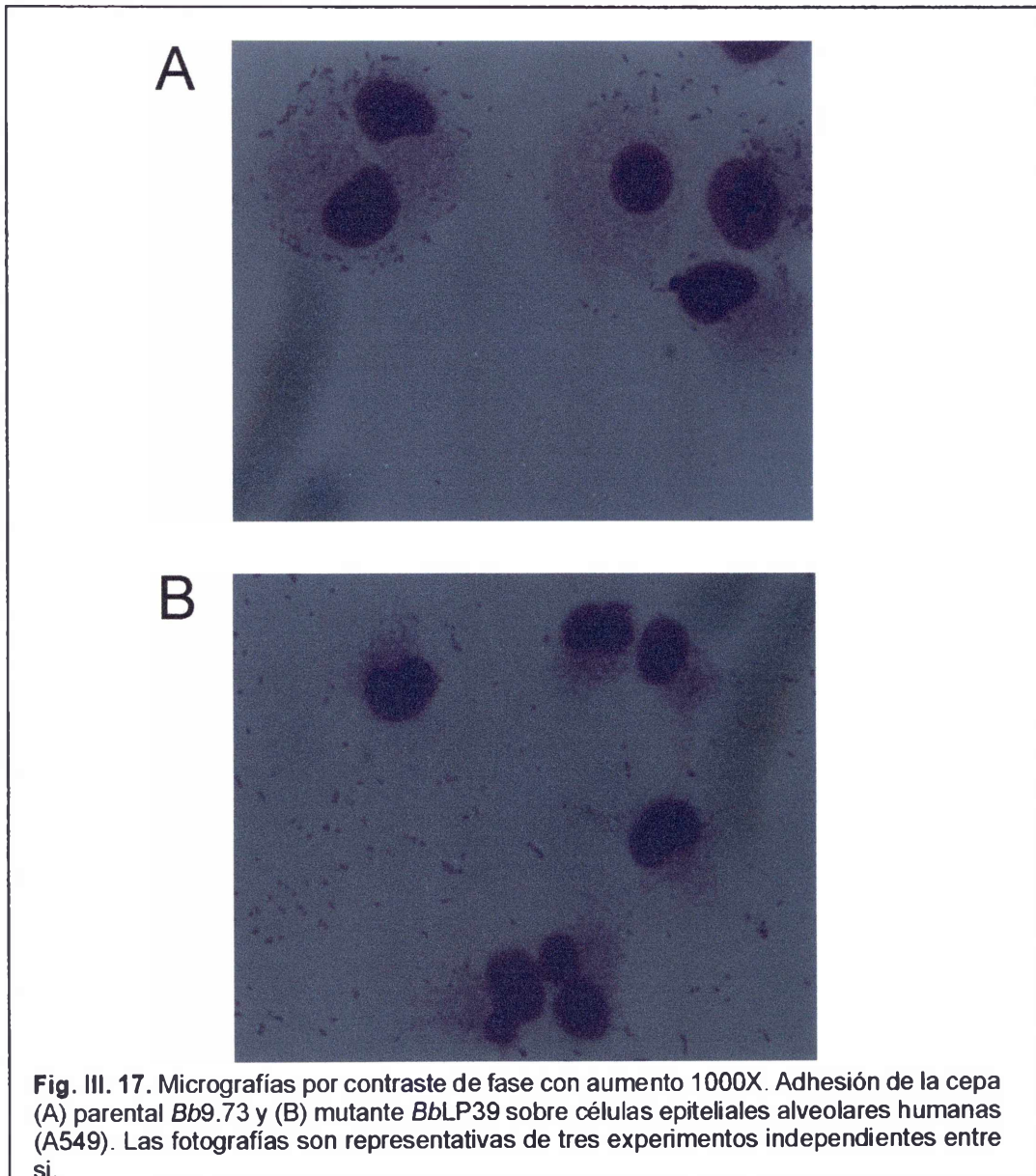
Fig. III.15. Ensayos de infección de *B. bronchiseptica* *in vivo*. Ratones BALB/c hembras de 3 semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal con 50 μ l con aprox. 5×10^5 de *Bb9.73* en fase virulenta. Transcurridos 5 días la mitad de los animales se reinocularon con (A) 5×10^4 bacterias *BbGFP* (—♦—) o (B) 5×10^4 bacterias *BbLP39* (—■—). En los días posteriores al momento de la inoculación indicados los ratones fueron sacrificados. A partir de cada ratón se extrajeron los pulmones los cuales fueron homogenizados, diluidos y plaqueados adecuadamente para realizar el recuento de bacterias. Los valores representan el promedio obtenido de tres ratones en cada punto.



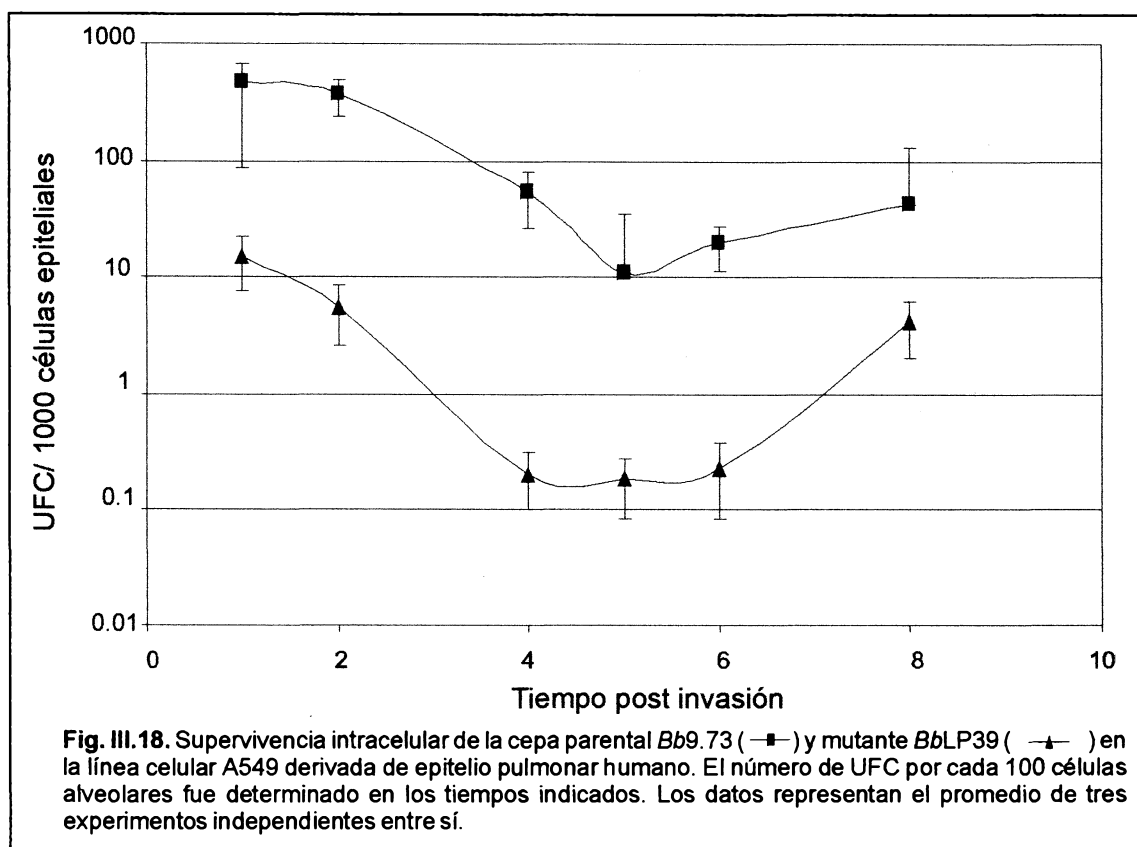
Adhesión y supervivencia de *BbLP39* en cultivos *in vitro*. Con el fin de analizar si la ausencia de las estructuras distales del LPS de la superficie de la bacteria afecta el proceso de adhesión a células epiteliales se realizaron ensayos de adhesión *in vitro* empleando células derivadas del epitelio pulmonar humano (A549). La elección de esta línea celular se basó en que este tipo de tejido es el que *B. bronchiseptica* encuentra en el transcurso del proceso infeccioso.

Los ensayos consistieron en incubar las suspensiones bacterianas de cada una de las cepas a analizar con cultivos de las células epiteliales desarrolladas hasta un 70-80% de confluencia. Para facilitar el proceso de adhesión y posterior invasión, se centrifugaron las bacterias sobre las monocapas de las células eucariotas. Transcurridas dos horas de incubación, se determinó el número de bacterias adheridas por célula epitelial. Los resultados obtenidos mostraron que el número de bacterias de la cepa mutante *BbLP39* adheridas a las células eucariotas fue significativamente menor (5 ± 4 bacterias/célula epitelial) respecto al correspondiente de la cepa parental (62 ± 5 bacterias/células epiteliales) (Fig. III.17). Más aún la distribución de *BbLP39* a lo largo de los campos observados fue de

manera errática encontrando mayoritariamente células bacterianas en el espacio intracelular y algunas pocas sobre las células eucariotas, no así en el caso de la cepa parental en donde las bacterias se encontraban circunscriptas a la superficie de las células eucariotas. A pesar del descenso observado en el número de bacterias adheridas de *BbLP39* se pudo observar que la pequeña población que permanecía sobre las células epiteliales era capaz de iniciar un proceso de invasión y supervivencia en la célula epitelial. Esta capacidad de invadir células eucariotas fue previamente descrita por varios autores (50, 107). La cinética de supervivencia intracelular de la cepa mutante fue similar a la de la cepa parental (Fig. III.18). Para ambas cepas, en los primeros 5 días la cantidad de bacterias por célula epitelial disminuyó para luego aumentar de manera constante. Los ensayos de supervivencia no



pudieron ser seguidos más allá del octavo día debido a que la viabilidad de las células eucariotas decrecía rápidamente una vez transcurrido ese período.



DISCUSION

El lipopolisacárido (LPS) es considerado como un factor de virulencia para muchos patógenos Gram negativos (77). Sin embargo, dentro del género *Bordetella* la asignación de roles para esta macromolécula resultó postergado debido a que durante mucho tiempo las investigaciones sobre *Bordetella* se focalizaron sobre los factores de naturaleza proteica. Sólo recientemente, gracias a los avances logrados a nivel bioquímico y genético sobre las vías de biosíntesis y ensamblaje del LPS que permiten la construcción de mutantes definidos, se ha comenzado a vislumbrar la importancia del LPS en el desarrollo de la infección (16, 94).

Así, Spears y colaboradores aislaron y caracterizaron dos mutantes de *B. avium* defectivos en *wlb*. Estos mutantes con el LPS alterado resultaron ser incapaces de desarrollar efectivamente la colonización en la tráquea de los pavos. Se observó además que deleciones en *wlb* de las otras tres especies, *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* conducen a un LPS incompleto. Esta alteración en el LPS permitió demostrar que el LPS completo es esencial en la virulencia de cada una de estas especies. West y colaboradores (2000) (137), describieron que un mutante resultante de una inserción en el gen que codifica para una fosfoglucomutasa (*Bb7865pgm*) presenta disminuida su capacidad de sobrevivir tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo en ninguno de estos trabajos se describe el rol del fenotipo *deep rough* del LPS que es uno de los observados durante la infección causada por *B. bronchiseptica* en humanos. Más aún, todavía no se le ha asignado ningún rol al LPS durante el período de cronicidad de la infección. Esta etapa de la infección es la menos estudiada pero no por ello la menos importante. Las bacterias que persisten contribuyen a la existencia de focos de contagio dificultando una erradicación efectiva de la enfermedad por lo que resulta esencial avanzar en el conocimiento de los distintos factores que están involucrados en esta etapa.

Para esclarecer entonces la contribución del LPS y su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia de *B. bronchiseptica* en el hospedador hemos dirigido nuestra investigación hacia la construcción y caracterización tanto *in vivo* como *in vitro* de un mutante de *B. bronchiseptica* que presenta un LPS alterado similar al observado en un proceso infeccioso.

Al inicio de mi trabajo de tesis el grado de conocimiento alcanzado sobre la estructura del LPS y los genes involucrados en la síntesis del LPS de *B. bronchiseptica* era escaso. Es por ello que como un primer paso en el estudio de esta macromolécula se decidió obtener un mutante con el LPS alterado empleando la estrategia de mutagénesis al azar. La misma se realizó mediante el empleo del transposón Tn5 (presente en el plásmido suicida pSUP1021) sobre una cepa caracterizada, Bb9.73 (proveniente del Instituto Pasteur de París, Francia) que presenta un LPS completo. En base a características fenotípicas ya descritas tales como la alteración de la sensibilidad a detergentes, se seleccionaron transconjugantes de *B. bronchiseptica* que podrían contener alterado su LPS. A partir de estos transconjugantes se

obtuvieron los LPS y se los sometieron a corridas electroforéticas. Se seleccionó un transconjugante (de aquí en más denominado *BbTn5*) que presentó una profunda modificación en la estructura del LPS con un perfil electroforético consistente en una única banda de movilidad ligeramente mayor a la banda B de la cepa parental. Este perfil se correspondería con una estructura del LPS carente de antígeno O, trisacárido y parte importante del core. Mediante ensayos de Southern blot pudimos verificar que el fenotipo observado se debía a una única inserción del transposón Tn5 y mediante la secuenciación de las regiones adyacentes al sitio de inserción del mismo pudimos determinar que el gen alterado se correspondía con una metiltransferasa. Para avanzar en la caracterización de *BbTn5* analizamos la expresión de los diferentes factores de virulencia. Así pudimos observar que la actividad hemolítica de *BbTn5* en cajas SSs era negativa ya que no se observaron halos de hemólisis. La ausencia de esta actividad es un comportamiento propio de aquellas cepas que se encuentran en fase avirulenta (25). Este fenotipo podría estar asociado de manera directa con la mutación realizada o bien podría deberse a que la inserción del transposón haya ocurrido sobre una cepa avirulenta espontánea. La propuesta de esta última posibilidad se debe a que la frecuencia con que ocurren las variaciones de fase irreversible en *Bordetella* es de 10^{-6} por lo que es factible de observar durante la conjugación la aparición de colonias avirulentas dentro de la población virulenta. Los resultados respecto a la ausencia de expresión de marcadores de virulencia y a la presencia de marcadores de avirulencia concuerdan con esta segunda opción, es decir la transposición ocurrió sobre una variante avirulenta.

La obtención de *BbTn5* si bien permitió determinar la presencia de un gen involucrado en la síntesis del LPS, no posibilitó la realización de estudios *in vivo* considerados como los óptimos para avanzar en el esclarecimiento del rol de los factores bacterianos. Esta imposibilidad surge como consecuencia por un lado de que se trata de una mutación que podría alterar la síntesis de otros componentes bacterianos (138, 139, 140, 141) y por el otro de que *BbTn5* fue obtenido sobre una fase avirulenta que no expresa la mayoría de los factores de virulencia necesarios para iniciar la infección. Por esta razón se decidió no continuar los estudios con este mutante y construir otro mutante pero con una alteración conocida.

La información que se obtuvo a partir de 1996 sobre las secuencias de alguno de los genes involucrados en la síntesis del LPS de *B. bronchiseptica* (1), nos permitió realizar una mutación en esta bacteria de manera dirigida. El objetivo fue construir un mutante con un LPS que presente la mayor alteración posible sin impedir la viabilidad del mismo y que presente un fenotipo similar al observado en los aislamientos obtenidos durante el periodo crónico de la enfermedad. Esa alteración que debería conducir al fenotipo *deep rough* buscado, podría obtenerse interrumpiendo al gen *waaA* que codifica para la enzima responsable del agregado de la única molécula de KDO presente en el lípido A de *B. bronchiseptica* (Fig. III.1) (1). Sin embargo la interrupción de este gen en *Escherichia coli* ha sido descripta como letal, ya que la modificación que se produce en la estructura del LPS

provoca una desestabilización muy marcada en la membrana externa imposibilitando la viabilidad de la bacteria (125). Por lo tanto nosotros no seleccionamos a *waaA* como candidato a ser interrumpido y en su lugar elegimos al gen *waaC* (Fig. III.1). Este gen que codifica para la heptosiltransferasa I, que es la encargada de catalizar el agregado de la primer heptosa sobre la molécula de KDO. Mutaciones en este gen en *Salmonella typhimurium*, y en otras bacterias, condujeron a la obtención de mutantes viables con un LPS deep rough rugoso profundo, caracterizados por una mayor movilidad electroforética de la banda correspondiente al lipido A-core (109).

Realizamos la construcción en el gen *waaC* sobre la cepa *B. bronchiseptica* 9.73 en fase virulenta. Algunos autores habían sugerido, dada la ubicación de *waaC* en el genoma de *B. bronchiseptica* (Fig. I.6), que la interrupción en este gen podría tener algún efecto polar sobre la expresión de *waaA* por lo que la bacteria no sería viable (1). Sin embargo, en el presente capítulo se detalla la obtención por primera vez de una cepa de *B. bronchiseptica* cuyo gen *waaC* se encuentra interrumpido sin alterar la viabilidad de la bacteria. A este mutante lo hemos denominado *BbLP39*. Mediante la técnica de Southern blot pudimos determinar que *BbLP39* presenta una única inserción sitio específica en el gen *waaC*, tal como se detalla en los resultados de este capítulo (pág. 100). El LPS de esta bacteria presenta el fenotipo esperado para este tipo de mutaciones y como puede observarse en la figura III.5 el perfil electroforético obtenido en geles de poliacrilamida con SDS, consiste en una única banda de mayor movilidad respecto a cualquiera de las correspondientes al LPS salvaje. Esa banda correspondería a la estructura formada de manera exclusiva por lipido A-KDO, la cual presenta mayor movilidad que la banda B de la cepa parental compuesta por lipido A-core. La cepa *BbLP39*, a pesar de disponer de todos los genes necesarios para la síntesis del resto del LPS, no presenta estructuras como el antígeno O o un core completo. Esto puede deberse a que la síntesis del LPS ocurre de manera secuencial, por lo que sería necesario la presencia de un sustrato determinado para que pueda agregarse el azúcar siguiente (108). De esta manera, la enzima responsable del agregado del siguiente azúcar en la estructura del core, en este caso una glucosa, reconocería como sustrato la estructura compuesta por lipido-A-KDO-heptosa. Si este sustrato no se encuentra presente, el resto de la molécula no podría ser sintetizado. Más aún, dado que la interrupción del gen *waaF* también genera sorpresivamente un LPS trunco (2), es probable que el sustrato deba incluir la presencia de ambas heptosas para ser reconocido luego como sustrato de las otras enzimas. Decimos sorpresivamente porque el gen *waaF* codifica para una enzima que cataliza el agregado de la siguiente heptosa sobre la primera pero en forma lateral (Fig. III.1). Si bien se ha descrito la obtención del mutante en *waaF* en *B. bronchiseptica*, lamentablemente hasta el presente no se ha reportado el comportamiento de este mutante *in vivo*. Otra explicación no excluyente a la anterior se basa en la consideración de la estructura propuesta para las glucosiltransferasas involucradas en la síntesis del core del LPS. Estas enzimas parecen formar un complejo que actuaría en forma conjunta (144) por lo que podría pensarse que la

ausencia de una de ellas imposibilita la formación de este complejo y en consecuencia no podrían actuar ninguna de las otras restantes. Esta hipótesis está sustentada en parte por el análisis estructural de estas enzimas que presentan regiones hidrofóbicas complementarias (144). Además existen reportes que muestran que la actividad de las glicosiltransferasas decae cuando existen alteraciones en la estequiometría de las diferentes enzimas. Esto se ha demostrado empleando vectores de copia múltiple de alguno de los genes que codifican para estas enzimas (108).

En nuestro caso es evidente que la ausencia de la porción distal del LPS surge como consecuencia de la interrupción del gen *waaC*. Una vez confirmada la presencia de una única inserción en el genoma de *Bb9.73* y que ésta se encontraba en el gen *waaC* y que el fenotipo rugoso profundo podía ser revertido en presencia de *waaC* en *trans*, se prosiguió con la caracterización del mutante *BbLP39*. En primer lugar analizamos la cinética de crecimiento *in vitro* en medio líquido de *BbLP39*. Mediante estos ensayos pudimos observar que *BbLP39* no presentaba diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa parental. Por otro lado la ausencia de diferencias significativas respecto al número de bacterias viables a lo largo de toda la curva de crecimiento hace factible la utilización de este mutante en futuros ensayos sin incurrir en las falsas interpretaciones que podrían surgir como consecuencia de cinéticas de crecimiento alteradas.

En mutantes con el LPS alterado es factible de observar modificaciones cuali y/o cuantitativa de las proteínas localizadas en la superficie de la bacteria (108) o de proteínas particulares como es el caso de las toxinas del grupo RTX al que pertenece adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella*. Con el fin de determinar si en *BbLP39* la ausencia de una estructura completa del LPS ocasionaba alguna alteración en el perfil proteico se analizó la expresión de aquellos factores considerados relevantes en la infección. En particular se analizó la expresión de proteínas de membrana externa (OMP), factores de virulencia de membrana tales como PRN o FHA y en particular estudiamos la expresión de la toxina RTX, AC-Hly. Mediante corridas electroforéticas y ensayos de western blot pudimos determinar que el mutante insercional *BbLP39* que presenta el fenotipo rugoso más profundo descrito hasta el momento dentro del género *Bordetella*, no presenta alteraciones a nivel de OMPs. Los perfiles electroforético de *BbLP39* resultaron similares cuali y cuantitativamente a los de la cepa parental. En relación a la expresión de las adhesinas corroboramos que las mismas se expresan en *BbLP39*, aunque con niveles disminuidos, siendo más pronunciada la disminución en la adhesina pertactina. Esta diferencia entre FHA y PRN quizás sea producto de una relación particular entre el LPS y la PRN, aspecto que sin duda requiere de más estudios.

Esta disminución observada en los factores de virulencia de naturaleza proteica resulta coincidente con lo observado durante las infecciones crónicas en humanos, en donde la expresión de los diferentes factores bacterianos va disminuyendo al acercarse al periodo de cronicidad (49). La disminución de la expresión observada tanto en los aislamientos de origen

humano como en *BbLP39* podría deberse a una inactivación del sistema BvgAS dado que es sabido que la expresión de dichas proteínas se encuentra reguladas en forma positiva por dicho sistema. Sin embargo al someter al mutante a la presencia de los moduladores conocidos *in vitro* de BvgAS se encontró que el sistema se encontraba funcional descartando la hipótesis anterior.

Si bien la situación *in vivo* y lo que se observa en el mutante construido por nosotros puede deberse a diferentes motivos, los resultados ponen en evidencia que la conexión entre la variación estructural del LPS y la expresión de factores de virulencia inmunogénicos existe y es a través de mecanismos independientes de BvgAS, más allá de que este sistema intervenga durante el proceso de infección *in vivo*.

En relación a la síntesis/secreción de toxinas RTX en varias bacterias Gram negativas ha sido posible determinar que la síntesis del LPS está asociada a la de estas proteínas (11). En *Bordetella* la información acerca de una posible relación entre su toxina RTX, adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly), y el LPS aún son desconocidos sólo se ha observado que ambas toxinas se co-secretan al mismo tiempo (55). Los aislamientos de *B. bronchiseptica* provenientes de infecciones crónicas en humanos presentan variaciones en la expresión de la toxina y en la estructura del LPS (48, 49). Ambos cambios se producen en forma conjunta lo que sugiere una posible interrelación entre ambas toxinas. Sin embargo, mediante ensayos de inmunoblot pudimos determinar que *BbLP39* presenta niveles de esta toxina comparables a los de la cepa parental. Para verificar este resultado construimos sobre *Bb9.73* una cepa defectiva en adenilato ciclasa-hemolisina (*Bbcya*⁻) y sobre este mutante analizamos la estructura del LPS en corridas electroforéticas. En este caso observamos que el mutante *Bbcya*⁻ no expresa la proteína RTX pero mantiene intacto su LPS. Estos resultados indicarían que en *B. bronchiseptica* la interrelación entre el LPS y AC-Hly no es tan clara como en el caso de las otras bacterias Gram negativas. Estudios más detallados serían necesarios para esclarecer los posibles mecanismos de regulación de la expresión que existen entre los diferentes factores involucrados en el proceso patológico. Mecanismos reportados en otras bacterias como aquellos que involucran efectos de antiterminación de la transcripción del ARNm o regulación a nivel de la expresión de los genes por reguladores de transcripción no pueden ser descartados (11, 75). La presencia de una regulación global de todos los factores de virulencia puede ser posible y su conocimiento permitiría comprender el proceso de infección a fin de desarrollar estrategias adecuadas para la definitiva erradicación de *Bordetella*.

A pesar de desconocer el mecanismo por el cual factores tan inmunogénicos como el LPS, AC-Hly, PRN y FHA cambian su estructura o dejan de ser expresados, es evidente que este evento se produce y se trataría de una estrategia desarrollada por el patógeno para persistir dentro del hospedador. En particular, la ausencia de las estructuras más inmunogénicas del LPS, es decir el antígeno O (77), puede ser relevante para la supervivencia de la bacteria durante la fase crónica. Es durante este periodo que la respuesta inmune remanente está

principalmente dirigida contra esta porción. La presencia de una respuesta importante contra las estructuras más antigénicas del LPS durante el período crónico de infección podría explicar la aparición durante este período de fenotipos rugosos profundos capaces de evadir la inmunidad humoral presente. De ser así la nueva estructura rugosa presente en estas bacterias no debería ser reconocida por el sistema inmune del portador, evadiendo de esta manera la respuesta en su contra. Con el fin de analizar esta posibilidad se realizaron ensayos de inmunoblot con el LPS de *BbLP39* y sueros de ratones obtenidos transcurridos al menos 300 días desde el momento de la inoculación de *Bb9.73* o provenientes de pacientes humanos con una infección crónica de *B. bronchiseptica*. Efectivamente este LPS rugoso profundo no es reconocido por ninguno de los sueros ensayados (Fig. III.5). Esto sugiere que la presencia en el hospedador de una respuesta humoral específica contra la porción distal del LPS durante el período crónico de infección podría intervenir en la inducción y/o selección de variantes rugosas profundas que pueden persistir de esta manera. Este aspecto se analizará con más detalle en el siguiente capítulo.

Una vez determinadas las características fenotípicas principales de *BbLP39* y considerando que no presentaba efectos fenotípicos importantes que pudieran perjudicar el desarrollo de una infección en un modelo murino, se evaluó la capacidad de este mutante de persistir y generar una infección crónica en ratones. La estrategia de infección utilizada obedeció a la necesidad de evaluar el progreso de una infección en un entorno lo más similar posible al presente durante una infección crónica. Este entorno presenta una respuesta inmune específica ya desarrollada por completo contra el patógeno. Por esta razón se decidió simular esta situación utilizando ratones que habían sido infectados previamente con la cepa parental *Bb9.73*. Sobre estos ratones infectados realizamos una segunda infección, pero la inmunidad presente en el momento de la segunda infección (34 días) fue suficiente para evitar la colonización por parte de las cepas reinoculadas. Las reinoculaciones se hicieron en dos grupos de ratones, uno con la cepa parental y otro con el mutante *BbLP39*. En ambos casos los resultados obtenidos fueron similares siendo las bacterias eliminadas del pulmón en el transcurso de los cinco días postinfección. La disminución de bacterias viables también se observó en la población correspondiente a la primera infección. Este descenso podría indicar que las bacterias reinoculadas hayan exacerbado la respuesta inmune en el animal infectado. Además el número de bacterias reinoculadas ($\sim 10^4$ UFC) fue similar al que se encontraría en ese día en una cinética de infección normal pero un orden de magnitud menor a las cantidades subletales ($\sim 10^6$ UFC), esto facilitaría aun más la rápida eliminación de las bacterias de la segunda inoculación. Si bien un número mayor de bacterias en la segunda inoculación podría revertir esta situación, la colonización por parte de un número exagerado no reproduciría la situación de cronicidad, por lo que esta posibilidad fue descartada.

Este tipo de ensayos fue repetido pero haciendo la segunda inoculación a los 5 días después de la primera inoculación. En estas condiciones, el mutante *BbLP39* nuevamente es

eliminado de los pulmones rápidamente, mientras que la cepa parental por el contrario sobrevive más allá del día doce posterior a la reinoculación. A los cinco días después de la primera infección, la respuesta humoral específica aún no se ha desarrollado por completo por lo que la causa de la eliminación rápida puede deberse a factores propios asociados a la mutación de la bacteria. Con el fin de evaluar si el mutante presenta una dificultad particular para desarrollar la infección se decidió realizar ensayos en los que se inocularon en una única dosis cantidades subletales del mutante *BbLP39* o de la cepa parental. Estos ensayos mostraron que *BbLP39* nuevamente es eliminado de los pulmones del ratón apenas transcurridos 3 días desde el momento de la inoculación, mientras que la cepa parental persiste en el hospedador por al menos 40 días, en concordancia con lo reportado previamente por Gueirard y colaboradores (48). Estos resultados ponen de manifiesto que el fenotipo rugoso profundo del LPS no es el adecuado para iniciar la colonización. A fin de evaluar más específicamente este aspecto, se analizaron aspectos particulares del proceso inicial de infección. Se evaluó la capacidad de adherirse y persistir en el medio intracelular en ensayos *in vitro* empleando células de línea. Ambos eventos son importantes para que se produzca la infección. En concordancia con los resultados obtenidos *in vivo*, el *BbLP39* presenta una capacidad disminuida para adherirse a células derivadas de epitelio de pulmón humano (A549) en comparación con la cepa parental. La ausencia de las estructuras distales del LPS en el mutante *BbLP39* quizás sea la responsable de la interacción ineficiente con componentes de la superficie eucariota truncando de esta forma la posibilidad de dar el primer paso indispensable en la infección. Esta deficiencia podría verse incrementada a su vez por la disminución de algunas de las adhesinas pero según lo informado hasta el momento la ausencia de PRN o de FHA parecen no resultar perjudiciales para el correcto desarrollo de los primeros pasos de la infección, al menos en la magnitud observada por nosotros en *BbLP39* (26). Esto reafirmaría el rol del LPS completo en las primeras etapas de la infección.

Pese a la deficiencia en la adhesión, la cinética de supervivencia del mutante *BbLP39* dentro de las células derivadas de epitelio pulmonar humano presenta perfiles indistinguibles al correspondiente a la cepa parental. Para ambas cepas se puede observar un descenso inicial en el número de bacterias en el interior de la célula. Este descenso podría estar asociado a un período de adaptación al medio intracelular. Seguidamente, se observa a lo largo del período analizado un aumento significativo en el número de bacterias por célula eucariota mostrando que ambas cepas de *B. bronchiseptica* son capaces no sólo de sobrevivir si no también de replicarse intracelularmente. La presencia de la estructura trunca no afectaría la vida intracelular de la bacteria, dado que fue posible aislar a *BbLP39* en los últimos períodos del ensayo. Debido a que a los 8 días de incubación se observó un importante incremento en la porción de células eucariotas muertas los experimentos no pudieron llevarse más allá de ese día. La capacidad que presenta el mutante rugoso profundo de sobrevivir al entorno intracelular epitelial permite suponer que es aquí en donde

la bacteria persiste durante el período crónico de infección. Ahora bien, como para poder ingresar a la célula es necesario en primer lugar adherirse y este es un proceso seriamente alterado en *BbLP39*, es posible pensar que el cambio en la estructura del LPS observado se produciría una vez dentro de la célula. Esto sugiere que la forma trunca del LPS aislada de estadios crónicos de la enfermedad en humanos no se corresponden con bacterias que iniciaron la infección sino que derivan de la forma lisa del LPS, forma con que la bacteria es capaz de colonizar. Las modificaciones concomitantes en la expresión de los principales factores de virulencia y la pérdida completa de la reactividad frente a sueros refuerzan la idea de que los cambios estructurales que ocurren durante la infección pueden ayudar a la bacteria a persistir en el hospedador.

Se ha puesto en evidencia una vez más la complejidad del rol protagonizado por una estructura no proteica como el lipopolisacárido. Para avanzar en el conocimiento del rol del LPS más allá de la colonización resulta primordial hacer que *BbLP39* supere las primeras etapas de la infección. En los capítulos siguientes hemos desarrollado diferentes experiencias con este fin.

REFERENCIAS

1. Allen A., Maskell D. 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 19:37-52.
2. Alien A.G., Thomas R.M., Cadisch J.T., Maskell D.J. 1998. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 29:27-38.
3. Amor K., Heinrichs D.E., Firdich E., Ziebell K., Johnson R.P. and Whitfield C. 2000. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 68:1116-1124.
4. Appelmek B.J., Shiberu B., Trinks C., Tapsi N., Zheng P.Y., Verboom T., Maaskant J., Hokke C.H., Schiphorst W.E., Blanchard D., Simoons-Smit i.M., van den Eijnden D.H., Vandenbroucke-Grauls C.M. 1998. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 66:70-6.
5. Appelmek B.J., Martin S.L., Monteiro M.A., Clayton C.A., McColm A.A., Zheng P., Verboom T., Maaskant J.J., van den Eijnden D.H., Hokke C.H., Perry M.B., Vandenbroucke-Grauls C.M., Kusters J.G. 1999. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun.* 67:5361-6. Erratum in: *Infect Immun* 67:6715.
6. Austin E.A., Graves J.F., Hite L.A., Parker C.T., Schnaitman C.A. 1990. Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J Bacteriol.* 172:5312-25.
7. Bailey M.J., Koronakis V., Schmoll T., Hughes C. 1992. *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol Microbiol.* 8:1009-12.
8. Bannerman D.D., Goldblum S.E. 2003. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284:L899-914.
9. Barbour A.G. 1990. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. *Annu Rev Microbiol.* 44:155-71.
10. Bastin D.A., Romana L.K., Reeves P.R. 1991. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the *rfb* gene cluster determining the O antigen of an *E. coli* O111 strain. *Mol Microbiol.* 5:2223-31.
11. Bauer M.E., Welch R.A. 1997. Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun.* 65:2218-24.
12. Blume E.D., Taylor C.T., Lennon P.F., Stahl G.L., Colgan S.P. 1998. Activated endothelial cells elicit paracrine induction of epithelial chloride secretion. 6-Keto-PGF1alpha is an epithelial secretagogue. *J Clin Invest.* 102:1161-72.
13. Borst P. 1991. Molecular genetics of antigenic variation. *Immunol Today.* 12:A29-33.
14. Bradford proteinas
15. Brunham R.C., Plummer F.A., Stephens R.S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-hostcoevolution. *Infect Immun.* 61:2273-6.
16. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, Harvill ET. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
17. Camprubi S., Merino S., Benedi V.J., Tomas J.M. 1993. The role of the O-antigen lipopolysaccharide and capsule on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection of the rat urinary tract. *FEMS Microbiol Lett.* 111:9-13.
18. Caroff M., Brisson J., Martin A., Karibian D. 2000. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477:8-14.
19. Caroff M., Chaby R., Karibian D., Perry J., Deprun C., Szabo L. 1990. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol.* 172:1121-1128.
20. Charles I.G., Dougan G., Pickard D., Chatfield S., Smith M., Novotny P., Morrissey P., Fairweather N.F. 1989. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3554-3558.
21. Chomczynski P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem.* 201:134-9.
22. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 173:33-8.
23. Cotter P.A., Jones A.M. 2003. Phoshorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 11:367-373.

24. Cotter P.A., Miller J.F. 1994. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 62:3381-90.
25. Cotter P.A., Miller J.F. 1997. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 24:671-85.
26. Cotter P.A., Miller J.F. 1998. In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 1:17-26.
27. Cotter P.A., Yuk M.H., Mattoo S., Akerley B.J., Boschwitz J., Relman D.A., Miller J.F. 1998. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 66:5921-5929.
28. de Kievit T.R., Lam J.S. 1997. Isolation and characterization of two genes, *waaC* (*rfaC*) and *waaF* (*rfaF*), involved in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 inner-core biosynthesis. *J Bacteriol.* 179:3451-7.
29. de Vries F.P., van Der Ende A., van Putten J.P., Dankert J. 1996. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun.* 64:2998-3006.
30. Deitsch K.W., Moxon E.R., Wellems T.E. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:281-93.
31. Deretic V., Schurr M.J., Yu H. 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol.* 3:351-6.
32. Di Fabio J.L., Caroff M., Karibian D., Richards J.C., Perry M.B. 1992. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 76:275-281.
33. Diedrich D.L., Stein M.A., Schnaitman C.A. 1990. Associations of *Escherichia coli* K-12 OmpF trimers with rough and smooth lipopolysaccharides. *J Bacteriol.* 172:5307-11.
34. Donelson J.E. 1995. Mechanisms of antigenic variation in *Borrelia hermsii* and African trypanosomes. *J Biol Chem.* 270:7783-6.
35. Donelson J.E. 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* 85:391-404.
36. Dutta R., Qin L., Inouye M. 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molec Microbiol.* 34:633-640.
37. Everest P., Li J., Douce G., Charles I., De Azavedo J., Chatfield S., Dougan G., Roberts M. 1996. Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology.* 142:3261-3268.
38. Fernandez-Prada C.M., Zelazowska E.B., Nikolich M., Hadfield T.L., Roop R.M. 2nd, Robertson G.L., Hoover D.L. 2003. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun.* 71:2110-9.
39. Finn T.M., Stevens L.A. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol.* 16:625-634.
40. Foxwell A.R., Kyd J.M., Cripps A.W. 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:294-308.
41. Genevaux P., Bauda P., DuBow M.S., Oudega B. 1999. Identification of Tn70 insertions in the *ptaG*, *ptaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol.* 172:1-8.
42. Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R. 1997. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun.* 65:4222-4228.
43. Girardin S.E., Sansonetti P.J. and Philpott D.J. 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* 10:193-199.
44. Gonzalez J.E., Reuhs B.L., Walker G.C. 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8636-41.
45. Goodman S.D., Scocca J.J. 1988. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6982-6.
46. Gross R., Rappuoli R. 1988. Positive regulation of pertussis toxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:3913-7.
47. Gueirard P., Guiso N. 1993. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4072-4078.
48. Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 162:331-337.

49. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. J Clin Microbiol. 33:2002-2006.
50. Guzman C.A., Rohde M., Timmis K.N. 1994. Mechanisms involved in uptake of *Bordetella bronchiseptica* by mouse dendritic cells. Infect Immun. 62:5538-5544.
51. Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 1999. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. Infect Immun. 67:6109-18.
52. Havarstein L.S., Hakenbeck R., Gaustad P. 1997. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. J Bacteriol. 179:6589-94.
53. Heinrichs D.E., Yethon J.A., Whitfield C. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Molec Microbiol. 30:221-232.
54. Hozbor D., Rodriguez M.E., Fernandez J., Lagares A., Guiso N., Yantorno O. 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. Curr Microbiol. 38:273-8.
55. Hozbor D., Rodriguez M.E., Samo A., Lagares A., Yantorno O. 1993. Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. Res Microbiol. 144:201-209.
56. Jacques M. 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends Microbiol. 4:408-9.
57. Janeway C. A. Jr. y Travers P. 1996. Immunobiology. The Immune system in health and disease. Segunda Edición. Cuurent Biology Limited San Francisco y Fladelfia y Garland Publishing Inc Nueva York y Londres Capítulo 9. Host defense against infection
58. Jennings M.P., Hood D.W., Peak I.R., Virji M., Moxon E.R. 1995. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol. 18:729-40.
59. Jennings M.P., Srihanta Y.N., Moxon E.R., Kramer M., Poolman J.T., Kuipers B., van der Ley P. 1999. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. Microbiology. 145:3013-21.
60. Jonsson A.B., Nyberg G., Normark S. 1991. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. EMBO J. 10:477-88.
61. Kahler C.M., Stephens D.S. 1998. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). Crit Rev Microbiol. 24:281-334.
62. Karkhanis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J., Carlo D.J. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. Anal Biochem. 85:595-601.
63. Kasuga, T., Nakase Y., Ukishima K. And Takatsu K. 1954. Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. Arch Exp Med 27:57-62.
64. Kerr J.R., Rigg G.P., Matthews R.C., Burnie J.P. 1999. The *bpeI* locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. Microb Pathog. 27:349-67.
65. Kim CH. 2003. A *Salmonella typhimurium rfaE* mutant recovers invasiveness for human epithelial cells when complemented by wild type *rfaE* (controlling biosynthesis of ADP-L-glycero-D-mannoheptose-containing lipopolysaccharide). Mol Cells. 15:226-32.
66. Kinnear S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. 2001. Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. Infect Immun. 69:1983-93.
67. Kitten T., Barrera A.V., Barbour A.G. 1993. Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. J Bacteriol. 175:2516-22.
68. Klena J.D., Gray S.A., Konkei M.E. 1998. Cloning, sequencing, and characterization of the lipopolysaccharide biosynthetic enzyme heptosyltransferase I gene (*waaC*) from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Gene. 222:177-85.
69. Komeda Y., Icho T., Iino T. 1977. Effects of *galU* mutation on flagellar formation in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 129:908-15.
70. Ladant D., Brezin C., Alonso J.M., Crenon I., Guiso N.. 1986. Purification and immunological characterization of bacterial and secreted adenylate cyclase of "*Bordetella pertussis*". Ann Sclavo Collana Monogr. 3:295-8.
71. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-5.
72. Laoide B.M., Ullmann A. 1990. Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* *cya* operon. EMBO J. 9:999-1005.
73. Le Blay K., Gueirard P., Guiso N., Chaby R. 1997. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiology. 143:1433-1441.

74. Lebbar S., Caroff M., Szabo L., Merienne C., Szilogyi L. 1994. Structure of a hexasaccharide proximal to the hydrophobic region of lipopolysaccharides present in *Bordetella pertussis* endotoxin preparations. Carbohydr Res. 259:257-275.
75. Leeds J.A., Welch R.A. 1996. RfaH enhances elongation of *Escherichia coli* hlyCABD mRNA. J Bacteriol. 178:1850-7. Erratum in: J Bacteriol 178:3989.
76. Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P., Brennan M.J. 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:345-349.
77. Lerouge I. and Vanderleyden J. 2001. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interacton. FEMS Microbiol Rev 26:17-47.
78. Li J., Clinkenbeard K.D. 1999. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect Immun. 1999 Jun;67(6):2920-7.
79. Li L.J., Dougan G., Novotny P., Charles I.G. 1991. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 5:409-17.
80. Martinez de Tejada G., Miller J.F., Cotter P.A. 1996. Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Mol Microbiol. 22:895-908.
81. Mattsby-Baltzer I., Ahlstrom B., Edebo L., de Man P. 1996. Susceptibility of lipopolysaccharide-responsive and -hyporesponsive ItyS Mice to infection with rough mutants of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 64:1321-7.
82. Melton A.R., Weiss A.A. 1989. Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 171:6206-12.
83. Middendorf B., Gross R. 1999. Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. Mol Gen Genet. 262:189-98.
84. Mills K.H. 2001. Immunity to *Bordetella pertussis*. Microbes Infect. 3:655-77.
85. Moller A.K., Leatham M.P., Conway T., Nuijten P.J., de Haan L.A., Kroghfelt K.A., Cohen P.S. 2003. An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. Infect Immun. 71:2142-52.
86. Mroczenski-Wildey M.J., Di Fabio J.L., Cabello F.C. 1989. Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of lipopolysaccharide. Microb Pathog. 6:143-52. Erratum in: Microb Pathog 6(4):precedi.
87. Nakamura Y., Wada M. 1998. Molecular pathobiology and antigenic variation of *Pneumocystis carinii*. Adv Parasitol. 41:63-107.
88. Nash T.E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. Mol Microbiol. 45:585-90.
89. Nikaido H., Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49:1-32.
90. Nilsson M., Norberg T. 2000. Synthesis of a spacer-containing disaccharide fragment of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide. Carbohydr Res. 327:261-267.
91. Parker C.T., Kloser A.W., Schnaitman C.A., Stein M.A., Gottesman S., Gibson B.W. 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 174:2525-38.
92. Persson C.G., Gustafsson B., Luts A., Sundler F., Erjefalt I. 1991. Toluene diisocyanate produces an increase in airway tone that outlasts the inflammatory exudation phase. Clin Exp Allergy. 21:715-24.
93. Porte F., Naroeni A., Ouahrani-Bettache S., Liautard J.P. 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. Infect Immun. 71:1481-90.
94. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevenes K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskell D.J. 1999. Genetics basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. Infect Immun. 67:3763-3767.
95. Preston A., Thomas R., Maskell D.J. 2002. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *wlb* LPS biosynthesis locus. Microb Pathog. 33:91-95.
96. Putney S.D., McKeating J.A. 1990. Antigenic variation in HIV/AIDS. 4 Suppl 1:S129-36.
97. Reeves P.R., Hobbs M., Valvano M.A., Skurnik M., Whitfield C., Coplin D., Kido N., Klens J., Maskell D., Raetz C.R., Rick P.D. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. 4:495-503.
98. Register K.B., Ackermann M.R. 1997. A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. Infect Immun. 65:5295-5300.

99. Regué M., Climent N., Abitiu N., Coderch N., Merino S., Izquierdo L., Altarriba M. and Tomás J.M. 2001. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* waa gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. J Bacteriol. 183:3564-3573.
100. Roche R.J., High N.J., Moxon E.R. 1994. Phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide: characterization of lipopolysaccharide from individual colonies. FEMS Microbiol Lett. 1994 Jul 15;120(3):279-83.
101. Roy C.R., Miller J.F., Falkow S. 1989. The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. J Bacteriol. 171:6338-6344.
102. Saint Girons I., Barbour A.G. 1991. Antigenic variation in *Borrelia*. Res Microbiol. 142:711-7.
103. Sambrook J., Fritsch E.F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^{da} Edición. ColdSpring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
104. Sambrook J., Fritsch E.F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^{da} Edición. ColdSpring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
105. Sandlin R.C., Lampel K.A., Keasler S.P., Goldberg M.B., Stolzer A.L., Maurelli A.T. 1995. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of *lcsA* in the bacterial outer membrane. Infect Immun. 63:229-37.
106. Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene. 145:69-73.
107. Schipper H., Krohne G.F., Gross R. 1994. Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun. 62:3008-11.
108. Schnaitman C.A. and Klena J.D. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. Microbiol Reviews. 57:655-682
109. Schnaitman CA. 1970. Examination of the protein composition of the cell envelope of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. J Bacteriol. 104:882-9.
110. Schwan E.T., Robertson B.D., Brade H., van Putten J.P. 1995. Gonococcal *rfaF* mutants express Rd2 chemotype LPS and do not enter epithelial host cells. Mol Microbiol. 15:267-75.
111. Seifert H.S. 1992. Molecular mechanisms of antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. Mol Cell Biol Hum Dis Ser. 1:1-22.
112. Seifert H.S. 1996. Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation. Mol Microbiol. 21:433-40.
113. Sen K., Nikaido H. 1991. Trimerization of an *in vitro* synthesized OmpF porin of *Escherichia coli* outer membrane. J Biol Chem. 266:11295-300.
114. Sen K., Nikaido H. 1991. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. J Bacteriol. 173:926-8.
115. Simon. 1983. Technology 1:784-791
116. Southern blot
117. Stainer D.W., Scholte M.J. 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. J Gen Microbiol. 63:211-220.
118. Stanley P.L., Diaz P., Bailey M.J., Gygi D., Juarez A., Hughes C. 1993. Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an *rfaP* lesion in core lipopolysaccharide assembly. Mol Microbiol. 10:781-7.
119. Tang H.B., DiMango E., Bryan R., Gambello M., Iglewski B.H., Goldberg J.B., Prince A. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect Immun. 64:37-43.
120. Tung W.L., Chow K.C. 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. Trends Genetics. 11:128-9
121. Turcotte M.L., Martin D., Brodeur B.R., Peppler M.S. 1997. Tn5-induced lipopolysaccharide mutations in *Bordetella pertussis* that affect outer membrane function. Microbiology. 143:2381-2394.
122. van den Berg B.M., Beekhuizen H., Willems R.J., Mooi F.R., van Furth R. 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. Infect Immun. 67:1056-1062.
123. van Putten J.P. 1993. Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. EMBO J. 12:4043-51.
124. Wagner P.L. and Waldor M.K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun. 70:3985-3993.
125. Belunis C.J., Clementz T., Carty S.M., Raetz C.R. 1995. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 270:27646-52.
126. Wandersman C., Letoffe S. 1993. Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin and *Erwinia chrysanthemi* proteases. Mol Microbiol. 7:141-50.

127. Wang G., Ge Z., Rasko D.A., Taylor D.E. 2000. Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol Microbiol.* 36:1187-96.
128. Watford W.T., Ghio A.J., Wright J.R. 2000. Complement-mediated host defense in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L790-8.
129. Weingart C.L., Broitman-Maduro G., Dean G., Newman S., Peppler M., Weiss A.A. 1999. Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun.* 67:4264-4267.
130. Weiser J.N., Maskell D.J., Butler P.D., Lindberg A.A., Moxon E.R. 1990. Characterization of repetitive sequences controlling phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* 172:3304-9.
131. Weiser J.N., Pan N. 1998. Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol.* 30:767-75.
132. Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. 1983. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 42:33-41.
133. Weiss A.A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. 1984. *Pertussis* toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 150:219-22.
134. Wylie J.L., Brunham R.C. 2000. Antigenic variation and the persistence of extracellular bacteria in vertebrate hosts. págs. 13-30. *Persistent Bacterial Infections*. Editado por Nataro J.P., Blaser M.J., Cunningham-Rundles S. ASM Press, Washington D.C.
135. Yethon J.A., Vinogradov E., Perry M.B., Whitfield C. 2000. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J Bacteriol.* 182:5620-3.
136. Yethon J.A., Gunn J.S., Ernst R.K., Miller S.I., Laroche L., Malo D., Whitfield C. 2000. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence *in vivo*. *Infect Immun.* 68:4485-91.
137. West N., Jungnitz H., Fitter J., McArthur J., Gúzman C. and Walker M. 2000. Role of phosphoglucomutase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect. Immun.* 68: 4673-4680.
138. Patterson J.H., McConville M.J., Hailes R.E., Coppel R.L., Billman-Jacobe H. 2000. Identification of a methyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* involved in glycopeptidolipid synthesis. *J Biol Chem.* 275:24900-6.
139. Terwilliger T.C., Bollag G.E., Sternberg D.W. Jr, Koshland D.E. Jr. 1986. S-methyl glutathione synthesis is catalyzed by the cheR methyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 165:958-63.
140. Lindstrom P.H., Stuber D., Bjork G.R. 1985. Genetic organization and transcription from the gene (*trmA*) responsible for synthesis of tRNA (uracil-5)-methyltransferase by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 164:1117-23.
141. Ny T., Bjork G.R. 1977. Stringent regulation of the synthesis of a transfer ribonucleic acid biosynthetic enzyme: transfer ribonucleic acid(m5U)methyltransferase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 130:635-41.
142. Pradel E., Schnaitman C.A. 1991. Effect of *rfaH* (*sfrB*) and temperature on expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 173:6428-31.
143. Zaleski A., Scheffler N.K., Densen P., Lee F.K., Campagnari A.A., Gibson B.W., Apicella M.A. 2000. Lipooligosaccharide P(k) (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) epitope of *Moraxella catarrhalis* is a factor in resistance to bactericidal activity mediated by normal human serum. *Infect Immun.* 68:5261-8.

CAPÍTULO IV

Ensayos tendientes a superar la deficiencia en la adhesión de las cepas que presentan alterado su LPS.

INTRODUCCIÓN

Hasta aquí nuestro trabajo estuvo dirigido hacia la construcción y caracterización tanto *in vivo* como *in vitro* de un mutante de *B. bronchiseptica* que presenta un LPS alterado, fenotipo *deep rough* (al que hemos designado *BbLP39*) con estructura similar a la observada en los aislamientos provenientes de los estadios crónicos de la enfermedad con el fin de esclarecer la contribución del LPS y su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia de *B. bronchiseptica* en el hospedador. Los resultados que hemos obtenido nos han permitido avanzar en el esclarecimiento del rol del LPS en los primeros estadios de la infección, sin embargo la dificultad del mutante *BbLP39* en lograr una colonización efectiva del tracto respiratorio del hospedador no nos permitió evaluar si la estructura trunca del LPS representa alguna ventaja durante el proceso crónico de infección. Los datos sobre la variación de la estructura del LPS desde una forma completa a una trunca a lo largo de un proceso infeccioso de *B. bronchiseptica*, sugieren fuertemente que esta molécula de estructura dinámica es parte de la estrategia desarrollada por el patógeno para evadir la respuesta inmune montada por el hospedador. En esta línea de pensamiento y según los resultados alcanzados en el capítulo anterior la presencia de un LPS completo de *B. bronchiseptica* no sólo es esencial en el proceso de adhesión sino que además esta estructura parecería ser la adecuada para evadir la respuesta propia de las primeras etapas de la infección del hospedador, es decir la inmunidad innata. En relación a este último aspecto, es bien conocido que el lipopolisacárido es uno de los componentes bacterianos que es reconocido por la inmunidad innata del hospedador constituida por barreras físicas tales como la piel, movimiento intestinal, movimiento oscilatorio de las cilias epiteliales, por células tales como fagocitos, células Natural Killers (NK) y por moléculas circulantes (complemento, quelantes de hierro, interferón, lisosimas, TNF- α , fibronectina, entre otras) (7, 9, 13). En particular, el LPS es reconocido por receptores específicos como el TLR-4 (*Toll Like Receptor-4*) que están presente en la membrana de la mayoría de las células. A través de la unión a ese receptor, el LPS induce la traslocación de NF- κ B al interior del núcleo en donde actúa como factor de transcripción para diferentes genes, entre ellos el de IL-8 que es un poderoso atrayente leucocitario, induciendo de esta manera la migración hacia el área afectada por la infección de las células de la serie blanca (neutrófilos y monocitos mayoritariamente). En el caso de la infección causada por *B. bronchiseptica*, la inmunidad desarrollada por el ingreso de la bacteria conteniendo un LPS completo parece no ser suficiente para erradicar al patógeno. Luego a medida que el proceso infeccioso avanza, otros componentes del sistema inmunológico diferentes a los de la respuesta innata se presentan constituyendo la inmunidad específica o adaptativa y en este marco inmunológico es donde se supone que el LPS de *B. bronchiseptica* de forma trunca juega un rol en la evasión de la respuesta ya montada por el hospedador. La profundización del conocimiento sobre este aspecto que es uno de los objetivos de nuestro trabajo no fue factible de ser abordado mediante el empleo de ensayos clásicos de infección ya que el mutante de *B. bronchiseptica* conteniendo la forma trunca del LPS es eliminado.

rápido del hospedador sin conseguir que la infección avance. A fin de lograr que *BbLP39* conteniendo el LPS de estructura trunca pueda colonizar el tracto respiratorio del hospedador en el modelo de infección intranasal de ratones, hemos ensayado modos de inoculaciones del patógeno más agresiva y debilitamiento del hospedador y de los mecanismos que este desarrolla para erradicar al patógeno.

Además realizamos infecciones sobre animales con títulos de anticuerpos característico del período crónico de la infección. El objetivo de estos últimos experimentos es evaluar si esa respuesta inmune propia de los estadios tardíos de la infección es la responsable del cambio estructural del LPS desde una forma completa hacia una forma trunca.

A continuación detallaré los materiales y métodos empleados como así también los resultados alcanzados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes: *Bb9.73*, *BbGFP* y *BbLP39* y se describen en la *Tabla III.2*. Las suspensiones bacterianas se conservaron como se describió anteriormente (páginas 63) y los cultivos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el Capítulo II, pág. 63.

Cuando fue necesario, se adicionaron a los medios de cultivo soluciones concentradas de antibióticos. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron para estreptomicina $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ o $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ y para kanamicina $80 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

2. Ensayos de infección en animales. Metodología general

Los ensayos de cinética de colonización *in vivo* se realizaron de la misma forma que la descrita en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II. Las cepas a ser ensayadas fueron cultivadas con agitación (160 rpm) a 37°C durante 12-14 horas en frascos erlenmeyers conteniendo el medio SS. La cantidad de bacterias presentes por ml de medio se estimó midiendo la DO a 650nm (1 unidad de Abs = $3 \cdot 10^9$ UFC ml^{-1}). Se realizaron las diluciones necesarias en buffer fosfato (PBS, cuya composición se detalla en el apéndice de este trabajo) estéril para obtener una concentración de 10^7 UFC ml^{-1} salvo que se indique lo contrario. Se utilizaron en todos los casos ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos. Los animales se anestesiaron por inhalación de éter y se inocularon con los volúmenes de la suspensión bacteriana que se indican más abajo. Transcurridas 4 horas desde el momento de la inoculación y en distintos días, se sacrificaron por dislocación tres animales. Se extrajeron ambos pulmones de cada ratón, los cuales fueron homogenizados para luego realizar las diluciones y recuentos de colonias en placas siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II (pág. 99) En el caso de *Bb9.73* se utilizaron placas conteniendo SSs suplementado con estreptomicina $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ y para *BbLP39* con kanamicina $80 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Los animales utilizados fueron mantenidos en jaulas acondicionadas con viruta de madera estéril, la cual fue cambiada periódicamente. Fueron alimentados con alimento balanceado (Extrudado balanceado de Agrupación Cooperativas Argentinas) estéril. Aquellos ratones a los que les fue inducida una neutropenia fueron mantenidos en cajas especiales de aislamiento, las cuales fueron abiertas cada vez que se requirió dentro del flujo laminar estéril. Durante este tipo de ensayos se realizaron recuentos del número de células de la serie blanca presentes en la sangre de los ratones. Para ello se utilizó la solución de Tuk (colorante vital azul de metileno y ácido acético al 5% v/v). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer al microscopio bajo aumento 400X.

Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los \log_{10} UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluados por un test de Student de dos colas con un grado de significación de $P < 0,05$.

3. Ensayos realizados para lograr una infección persistente de *BbLP39*

3.1. Aumento de la dosis subletal inicial. Se realizaron inoculaciones con suspensiones bacterianas conteniendo $5 \cdot 10^7$ UFC en lugar de $5 \cdot 10^5$ UFC para lo cual se partió de un cultivo líquido en SS de *BbLP39*. A partir del mismo se realizaron las diluciones adecuadas a fin de inocular en 50 μ l $5 \cdot 10^7$ UFC.

3.2. Modificación en el volumen de inoculación. En esta oportunidad se utilizó en lugar del volumen tradicional de 50 μ l un volumen mayor de 200 μ l de inóculo con $5 \cdot 10^6$ UFC.

3.3. Inhibición farmacológica del movimiento ciliar del hospedador. Para conseguir esta inhibición se utilizaron dos drogas por separado. Por un lado se utilizó al antagonista colinérgico atropina (Laboratorio Instituto Biológico Argentino S.A.I.C). Esta droga fue inoculada intraperitonealmente ($0,1 \text{ mg Kg de peso}^{-1}$) dos horas antes del momento de la inoculación de las bacterias. El otro fármaco utilizado fue el anestésico pentobarbital (Laboratorio Instituto Biológico Argentino S.A.I.C). Éste fue inoculado intraperitonealmente ($10 \text{ mg Kg de peso}^{-1}$) dos horas antes del momento de la inoculación de las bacterias. Como indicador de la presencia de actividad farmacológica de estas drogas se utilizó la inducción de actividad sedante en los animales tratados.

3.4. Inoculación de *BbLP39* en ratones neutropénicos. A fin de inducir neutropenia los animales fueron inoculados intraperitonealmente con $400 \text{ mg Kg peso}^{-1}$ de ciclofosfamida (Laboratorios Fiiaxis S.A.). Transcurridas 96 horas se reinoculó intraperitonealmente la misma cantidad de ciclofosfamida. Inmediatamente se procedió a la inoculación de los ratones con una suspensión de *BbLP39* (50 μ l de suspensión con aprox. $5 \cdot 10^5$ UFC).

3.5. Inoculación de ratones con la cepa mutante *BbLP39* obtenida de un cultivo realizado en condiciones en donde se favorece la expresión de adhesinas. La cepa mutante *BbLP39* fue cultivada en medio líquido SS en frascos erlenmeyer a 160 rpm y 22°C durante 12 horas con el fin de favorecer la expresión de adhesinas.

Mediante la determinación de DO a 650nm y diluciones adecuadas se inocularon por vía intranasal 100 μ l de suspensión bacteriana en PBS conteniendo $5 \cdot 10^6$ UFC. La presencia de proteínas adicionales presentes en *BbLP39* producto del crecimiento a bajas temperaturas fue analizada mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida. Se empleó para ello las técnicas ya descriptas en el capítulo anterior (pág. 93).

3.6. Coinoculación de *BbLP39* junto a la cepa parental *Bb9.73*. Los ensayos de coinoculación han sido utilizados en diversos tipos de estudios, tanto como para poner en evidencia dificultades en los procesos de competición por nichos ecológicos determinados como para complementar la deficiencia de una cepa con la presencia simultánea de otra (5). Con esta última finalidad diseñamos un ensayo de coinoculación consistente primero en una inoculación de los ratones en la cepa parental que podría complementar la deficiencia del mutante y dos horas después con la cepa mutante.

Para la primera inoculación se empleó 50 μ l de una suspensión bacteriana de la cepa *Bb9.73* conteniendo $5 \cdot 10^5$ UFC. Para la segunda inoculación se empleó 50 μ l de la cepa

BbLP39 también con 5.10^5 UFC. Como control se empleó un grupo de ratones también inoculados dos veces pero para la segunda inoculación se empleó la cepa *BbGFP*.

A diferentes tiempos después de la segunda inoculación se sacrificaron los distintos animales. A partir de éstos se extrajeron los pulmones los cuales fueron homogeneizados, diluidos y plaqueados para realizar recuento de las bacterias que se encontraban colonizándolo.

3.7. Inoculación de ratones con *BbLP39* por vía intraperitoneal. Determinación de la acción bactericida del suero. Con el fin de determinar si la acción bactericida presente en el animal de manera innata es capaz de impedir la infección si ésta se produce por vía intraperitoneal se realizó el siguiente ensayo. Se determinó la sensibilidad de *BbLP39* a la acción bactericida del suero. Esta actividad se ensayó tanto sobre la cepa parental como sobre el mutante rugoso profundo. Para ello se incubaron por separado 500 UFC de cada una de las bacterias en presencia del suero nativo 90% v/v durante 1 hora a 37° C sin agitación. Las cepas utilizadas fueron cultivadas previamente durante 12 horas a 37° C en frascos erlenmeyers agitados (160 rpm) conteniendo medio SS. La cantidad de bacterias presentes se determinó midiendo la DO a 650nm (1 unidad de Abs = 3.10^9 UFC ml⁻¹). Para alcanzar una concentración de 500 UFC en 5 µl se realizaron las diluciones en PBS estéril. Este volumen se agregó a 45 µl de suero descongelado previamente en baño de hielo-agua o en el caso de los controles 45 µl de PBS estéril contenidos en una placa de ELISA de 96 well con fondo en U. Luego de una hora de incubación la acción del complemento fue inhibida por dilución con 150 µl de PBS estéril. Posteriormente se sembraron 80 µl de esta suspensión en medio SSs conteniendo los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 48-72 horas y al cabo del mismo se contaron las colonias. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y en (al menos) dos ensayos independientes. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los log₁₀ UFC. Las diferencias entre los promedios fueron evaluados por análisis de varianza con un grado de significación de $P < 0.05$.

Una vez confirmado que la acción bactericida presente en el suero no podría eliminar al patógeno inoculado por vía intraperitoneal se realizaron los ensayos de inoculación con la cepa *BbLP39*. Se inocularon por vía intraperitoneal 5.10^5 bacterias *BbLP39* en 200 µl de PBS estéril. A los 4 días de la inoculación se sacrificaron los animales y se retiraron quirúrgicamente ambos pulmones, la tráquea, el hígado y el bazo. Todos los órganos fueron homogenizados y sembrados con las diluciones adecuadas en placas de SSs.

4. Análisis de la variación de la estructura del LPS de *Bb9.73* durante ensayos *in vivo*

Con el fin de analizar si la respuesta inmune montada es la responsable de la inducción del cambio de estructura en el LPS de *B. bronchiseptica* desde una forma completa a una trunca realizamos ensayos de infección en ratones previamente inmunizados activamente con LPS completo o pasivamente con suero anti-LPS completo. Para ello primeramente fue necesario para el primer caso purificar LPS y para el segundo además de purificar LPS,

obtener suero policlonal anti-LPS. El detalle experimental de los ensayos descritos se presentan a continuación.

Purificación del LPS. El LPS fue obtenido a partir de la cepa *Bb9.73* según se describió en el Capítulo II (pág. 64). La cuantificación del mismo se realizó siguiendo la metodología descrita por Karkanis y col. (1978) (10). La calidad de la preparación del LPS fue analizada mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida según hemos descrito en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II (pág. 64).

Obtención de suero anti-LPS *Bb9.73*. A partir de las preparaciones de LPS obtenidas se realizaron inoculaciones en ratones BALB/c (tres) por vía intraperitoneal. La cantidad de LPS empleada correspondió a 800 ng de Kdo. La misma antes de ser inoculada fue homogenizada con adyuvante de Freund completo. A los 15 y 21 días posteriores a la primera inoculación se realizaron nuevas inmunizaciones por la misma vía con la mezcla de LPS y adyuvante de Freund incompleto. Luego de 7 días de la última inmunización se extrajo a blanco la sangre de los ratones y se obtuvo el suero. Éste último fue alicuotado y conservado hasta el momento de ser utilizado a -20°C .

Análisis por ELISA de los sueros obtenidos. La determinación del título contra el LPS presente en los sueros obtenidos a lo largo de todos los experimentos que se detallan en esta sección fueron determinados por un ELISA tal como se describe a continuación. En primer lugar se sensibilizaron placas de ELISA de fondo plano (NUNC) con 100 μl de LPS de *Bb9.73* en fase virulenta ($80\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) purificado. Las placas así tratadas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C con agitación suave. Como bloqueante de uniones inespecíficas se empleó leche descremada (San Regim[®]) disuelta en TBS en una concentración de 5% p/v. Como primer anticuerpo se utilizaron diluciones seriadas de los diferentes sueros a evaluar. Como controles se utilizaron sueros de ratones sin infectar (suero normal, control negativo) y suero de ratones con una infección de *B. bronchiseptica* 9.73 (control positivo). El segundo antisuero utilizado fue un suero policlonal en cabra específico para IgG de ratón (H+L), conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc). La actividad fosfatasa presente en cada fosa se determinó con el sustrato p-nitro fenol fosfato mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Rainbow Tecan Spectra). Los resultados obtenidos fueron graficados ($\text{DO}_{405\text{nm}}$ vs dilución del suero⁻¹) y a partir de estos gráficos se determinó la dilución correspondiente al 50% de la máxima DO determinada. Este valor se utilizó como parámetro de comparación entre diferentes sueros.

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y las diferencias entre promedios fueron evaluados por un test de Student de dos colas con un grado de significación de $P < 0,05$.

4.1. Análisis de la variación de la estructura del LPS en ratones inmunizados con LPS liso. Primeramente se inoculó por vía intraperitoneal un grupo de ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad con LPS de *Bb9.73* (fase virulenta) previamente purificado mediante la técnica de Valverde y col. (1997) (16). Se realizaron 4 inoculaciones

con la cantidad de LPS equivalente a 800 ng de Kdo en cada una de ellas. La primer inoculación se realizó con adyuvante de Freund completo y las restantes con adyuvante incompleto. Transcurridos siete días desde el momento de la última inmunización se colectaron sueros de los animales para analizar su título mediante la técnica de ELISA descrita más arriba. Cuando el título alcanzó un valor de 1/300 se inocularon por vía intranasal 50 μ l de PBS con $5 \cdot 10^6$ UFC de *Bb9.73* cultivada en medio líquido SS (160 rpm, 37° C, 12-14 horas). A los 7, 14 y 21 días se sacrificaron animales a los que se les extrajo ambos pulmones. Los mismos fueron homogenizados en 1500 μ l de PBS y sembrados en SSs para recuento de colonias y análisis de LPS. Las colonias presentes a las 48 horas a 37° C fueron repicadas en SSs y posteriormente resuspendidas en glicerol 50% v/v en SS para ser conservada a -80°C. En forma paralela se purificó el LPS de estas bacterias mediante la técnica ya descrita (16). Estas preparaciones fueron analizadas por SDS-PAGE.

4.2. Análisis de la variación estructural del LPS en ratones inmunizados pasivamente con suero anti-LPS completo. Primeramente se inmunizaron pasivamente por vía intraperitoneal ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad con 150 μ l del suero específico para el LPS obtenido previamente (Título 1/5000). Luego de dos horas los ratones fueron inoculados por vía intranasal con $5 \cdot 10^6$ UFC de *Bb9.73* en 50 μ l de PBS, cultivadas en las condiciones habituales (160 rpm, 37° C, 12-14 horas). Transcurridos 5, 15 y 22 días un grupo de ratones fue sacrificado. A partir de estos ratones se extrajeron ambos pulmones los cuales fueron homogenizados en 1500 μ l de PBS y sembrados en medio SSs. Luego de 48 horas a 37° C las colonias desarrolladas fueron repicadas en SSs para proceder a la extracción y análisis de la estructura del LPS mediante corridas electroforéticas en SDS-PAGE según hemos descripto en el capítulo II (pág. 64).

En el momento de la inoculación y cada vez que fueron sacrificados los animales también se obtuvo suero para analizar el título del mismo mediante la técnica de ELISA arriba descrita. Para ello se extrajeron aproximadamente 300 μ l de sangre total de la cola del ratón la cual fue incubada a 37° C durante media hora. Luego de la incubación la sangre fue centrifugada durante 5 minutos a 20000 X g y el sobrenadante fue conservado a -20° C hasta el momento de ser utilizado.

RESULTADOS

Ensayos realizados para lograr una infección persistente de *BbLP39*

Aumento de la dosis subletal inicial. Para favorecer la adhesión de las *BbLP39* en el hospedador se inocularon ratones BALB/c con dosis de $5 \cdot 10^7$ UFC en 50 μ l de PBS, es decir mayores a la utilizadas en los ensayos clásicos ($5 \cdot 10^5$ UFC en 50 μ l de PBS). Luego de 4 y 72 hs postinfección fueron sacrificados los ratones infectados, se extrajeron sus pulmones y se homogenizaron para realizar las diluciones adecuadas para el recuento de colonias. Lamentablemente en ninguno de los tiempos analizados fue posible detectar la presencia de bacterias *BbLP39*.

Modificación en el volumen de inoculación. Durante los ensayos clásicos de infección en ratones, el inóculo es introducido a través de las fosas nasales de forma que el ratón por simple aspiración permite que la suspensión bacteriana entre en contacto con el interior de las fosas nasales y la porción superior de la tráquea. Las bacterias luego se distribuye a través del resto del tracto respiratorio hasta alcanzar los pulmones. Todo este proceso transcurre en menos de 4 horas, ya que transcurrido este tiempo es posible detectar la presencia de *B. bronchiseptica* en los pulmones. En el transcurso del pasaje desde las vías superiores al pulmón, la bacteria es sometida a diferentes agresiones por parte del sistema inmune nativo del animal que podrían resultar deletéreas para el proceso infectivo de *BbLP39*. A fin de lograr una infección directa en los pulmones, se decidió realizar inoculaciones con volúmenes de inóculo más grandes según los protocolos antes reportados por otros autores (4). Para ello se emplearon volúmenes totales de 100 μ l o 200 μ l, con $5 \cdot 10^6$ UFC en ambos casos. Con esta metodología de infección se logró recuperar bacterias de los pulmones sólo 4 hs después de la infección. Los resultados para un tiempo de 72 hs post infección fueron negativos.

Inhibición farmacológica del movimiento ciliar del hospedador. En las primeras etapas del ciclo infectivo son varios los procesos que entran en juego hasta que la bacteria logra la adhesión y la colonización de los tejidos. Estos procesos que resultan dificultosos de ser evaluados en los ensayos *in vitro*, por ejemplo el movimiento ciliar de las células epiteliales ciliadas, podrían ser parte de los mecanismos por los cuales el mutante *BbLP39* no pueda adherirse a las células del hospedador próximas a las vía de entrada del patógeno. Con el fin de bloquear ese mecanismo de eliminación se decidió emplear fármacos específicos para tal fin (4). Se utilizó entonces un anticolinérgico (atropina por vía intraperitoneal 0,1 mg Kg de peso⁻¹). Cuando el ratón presentó uno de los signos de la actividad farmacológica de la atropina como es la sedación, se los inoculó por vía nasal con la cepa *BbLP39* en alta dosis y alto volumen ($5 \cdot 10^6$ bacterias en 150 μ l de PBS). A pesar de que el ratón presentaba todos los signos de la acción farmacológica de la atropina no fue posible aislar a *BbLP39* del pulmón de los ratones infectados transcurridas 72 horas de la infección.

Posteriormente y con el fin de lograr una acción local de la atropina sobre el movimiento ciliar se inocularon ratones con suspensiones bacterianas que contenían atropina. En una primera etapa se determinó si la concentración de atropina requerida era

inhibitoria del crecimiento de *BbLP39*. Para esto se incubó una suspensión bacteriana en $0,1 \text{ g ml}^{-1}$ de atropina en PBS con aproximadamente $5 \cdot 10^5$ bacterias en $50 \mu\text{l}$ durante 4 horas a 37°C . Este tiempo sería similar al que probablemente la bacteria se encontraría en contacto con el medio líquido de la suspensión durante la infección. Transcurrido el tiempo de incubación se sembraron diluciones de las suspensiones y se determinó el porcentaje de supervivencia en comparación con una suspensión sin atropina. En estos experimentos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin atropina. Una vez determinado que las concentraciones a utilizar de atropina no disminuían en forma significativa la viabilidad de *BbLP39* se realizó la inoculación de los ratones BALB/c por vía intranasal de una suspensión bacteriana conteniendo atropina ($0,1 \text{ g ml}^{-1}$ de atropina en PBS con aproximadamente $5 \cdot 10^5$ bacterias en $50 \mu\text{l}$). Una vez transcurridas 96 horas se sacrificaron los ratones infectados y a ellos se les extrajo los pulmones para analizar en número de bacterias que se encontraban colonizando dichos órganos.

Lamentablemente en ninguno de los ratones analizados pudimos recuperar colonias correspondientes a *BbLP39*.

Este resultado encontrado con la atropina fue similar al que obtuvimos cuando reemplazamos la atropina por un anestésico como el pentobarbital. En este caso empleamos dosis de $10 \text{ mg Kg de peso}^{-1}$ suficientes para ocasionar el sueño profundo del animal. La acción farmacológica de anestésicos ya había sido reportada como suficiente para revertir el fenotipo no adhesivo de un mutante de FHA en *B. bronchiseptica* (4).

Inoculación de *BbLP39* en ratones neutropénicos. Durante la etapa en que *BbLP39* es eliminada del tracto respiratorio, el hospedador aún no ha desarrollado una respuesta inmunológica específica contra el patógeno. En ese momento sólo se encuentra presente la inmunidad innata mediada, entre otros, por los factores involucrados en la acción del complemento del suero y por algunas de las células de la serie blanca, entre ellas los neutrófilos (9). Estas células son reclutadas en gran número al espacio pulmonar durante las infecciones causadas por *B. bronchiseptica* (6). Este reclutamiento de neutrófilos sería de vital importancia para el control del proceso de infección (6). A fin de determinar si la acción bactericida de los neutrófilos es la responsable de la rápida erradicación de *BbLP39* del animal se realizaron ensayos de infección en ratones neutropénicos. Para inducir la neutropenia del animal, el mismo fue tratado con ciclofosfamida (6), la cual se inyectó intraperitonealmente ($400 \text{ mg Kg peso}^{-1}$). Transcurridas 96 horas se repitió la inyección por vía intraperitoneal de ciclofosfamida en la misma cantidad. El número de células de la serie blanca presente en sangre fue determinado previamente a la inoculación de las bacterias. Confirmada así la ausencia de este tipo de células procedimos a la inoculación con el mutante *BbLP39* a ratones por vía intranasal. A las 72 horas postinfección se sacrificaron los animales, se extrajeron los pulmones, bazo, hígado y tráquea para homogeneizarlos y realizar el recuento de colonias en placas conteniendo medio SSs. De ninguno de los órganos analizados pudimos recuperar bacterias. En el momento de ser sacrificados los animales, también se corroboró la ausencia de células de la serie blanca.

Inoculación de ratones con la cepa mutante *BbLP39* obtenida de un cultivo realizado en condiciones en donde se favorece la expresión de adhesinas. Register y colaboradores (1997) reportaron que cuando *B. bronchiseptica* es cultivada a 22° C, la adhesión y la persistencia de la bacteria en células de epitelio nasal porcino resultan más eficientes que aquellas observadas cuando la bacteria fue cultivada a 37°C (14). Esta mejora en la eficiencia de adhesión fue atribuida a proteínas sintetizadas en forma exclusiva durante el crecimiento de la bacteria a 22° C. Por otro lado, *B. bronchiseptica* cultivada a estas temperaturas modula negativamente a través de BvgAS la expresión de otras adhesinas y factores de virulencia que son indispensables para el desarrollo de la infección (12). Sin embargo, la infección de *B. bronchiseptica* en fase avirulenta es alcanzada con éxito si el sistema BvgAS no se encuentra bloqueado, debido a que la bacteria es capaz de cambiar de fase hacia una virulenta cuando se encuentra dentro del hospedador (11).

Con el fin de observar entonces si la expresión de estas adhesinas propias de los cultivos a 22° C aumentaban la eficiencia de adhesión en *BbLP39* se inocularon ratones con *BbLP39* cultivada a esa temperatura. Para verificar que realmente en esta condición se expresaban diferentes proteínas respecto a bacterias obtenidas en condiciones de cultivo virulento (37°C), se analizaron las proteínas totales de *BbLP39* cultivadas a 22° C o a 37° C en corridas electroforéticas en SDS-PAGE (Fig. IV.1). El perfil electroforético presentado por el mutante cultivado a baja temperatura presentó un perfil diferente al presente durante los cultivos a 37°C. Una vez determinado que las condiciones de modulación utilizadas modificaban el patrón proteico del mutante, se cultivó procedió a inocular los ratones con *BbLP39* cultivada a 22° C, 160 rpm durante 12-14 horas. A cuatro días después de la infección, los ratones fueron sacrificados y a partir de los homogenados de pulmón se analizó la presencia de bacterias en los mismos. A pesar de la probable actividad de adhesión adicional presente en la fase presentada al crecer a 22° C, ésta no fue suficiente para revertir el comportamiento *in vivo* presentado por *BbLP39*, es decir no pudimos recuperar colonias a distintos tiempos post infección.

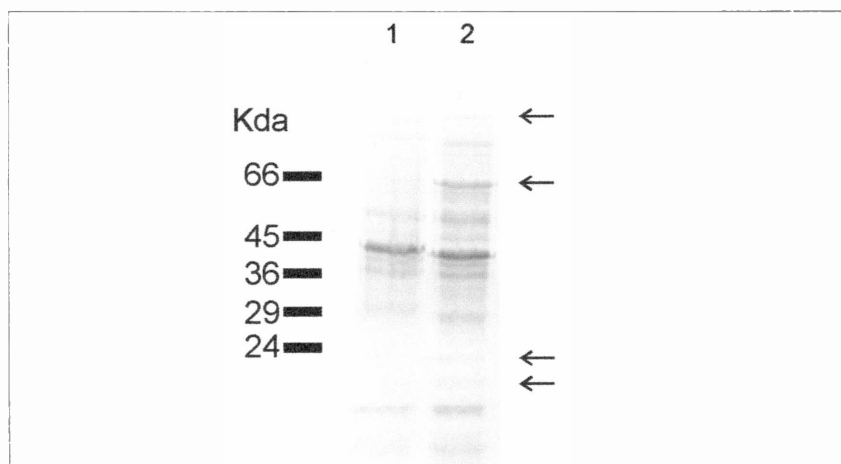
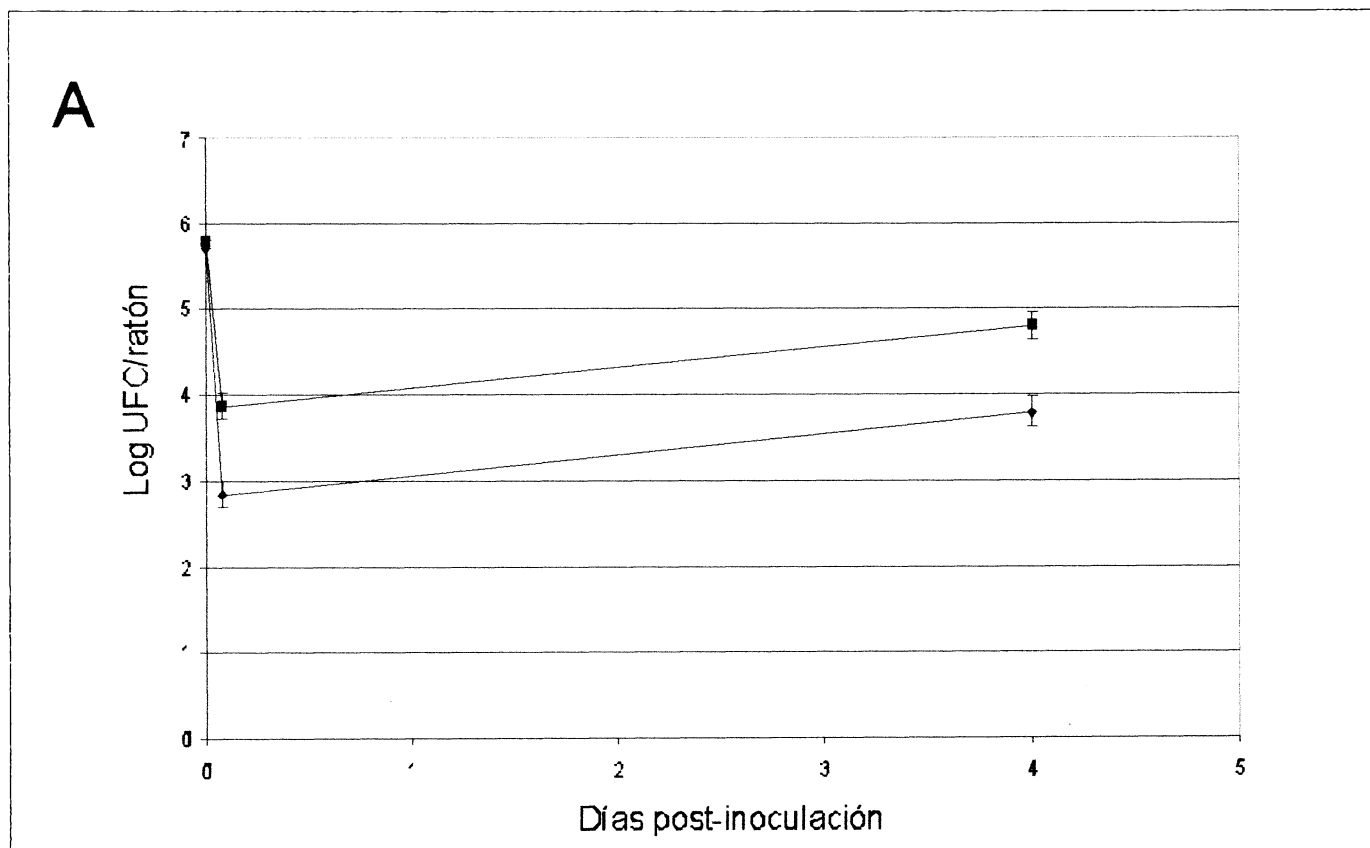


Fig. IV.1. SDS-PAGE de proteínas totales a partir de cultivos de: *BbLP39* en fase virulenta (línea 1) y *BbLP39* (línea 2) en fase avirulenta. Las proteínas fueron teñidas con coomasie blue. Se indica con flechas la presencia de las bandas adicionales.

Coinoculación de *Bb*LP39 junto a la cepa parental *Bb*9.73. En otras bacterias Gram negativas los efectos causados por la falta de un componente bacteriano que se libera al medio extracelular pueden ser complementados mediante el agregado en forma externa de moléculas en estado salvaje (4,5). En *Bordetella* se ha descrito el LPS es liberado al medio extracelular (8), este LPS liberado desde una cepa salvaje podría entonces complementar la deficiencia que presenta *Bb*LP39 en la etapa de adhesión. Con el fin de evaluar esta posibilidad de complementación *in vivo*, se inocularon ratones con una suspensión compuesta por cantidades iguales de *Bb*9.73 y *Bb*LP39. En forma paralela como control se inocularon ratones con una suspensión de *Bb*GFP y *Bb*9.73. A las 4 horas y días subsiguientes, los ratones fueron sacrificados y de cada animal se les extrajo los pulmones los cuales fueron homogenizados y diluidos para realizar el recuento de bacterias. El análisis del perfil de supervivencia, de ambas cepas inoculadas, se muestra en la figura IV.2. Como puede observarse en dicha figura, la cepa parental no presentó dificultad alguna en desarrollar un proceso infeccioso al ser coinoculada junto a *Bb*LP39. Sin embargo *Bb*LP39 nuevamente fue eliminada rápidamente del hospedador siguiendo una cinética indistinguible a la presente en inoculaciones protagonizadas por esta cepa en forma individual.



B

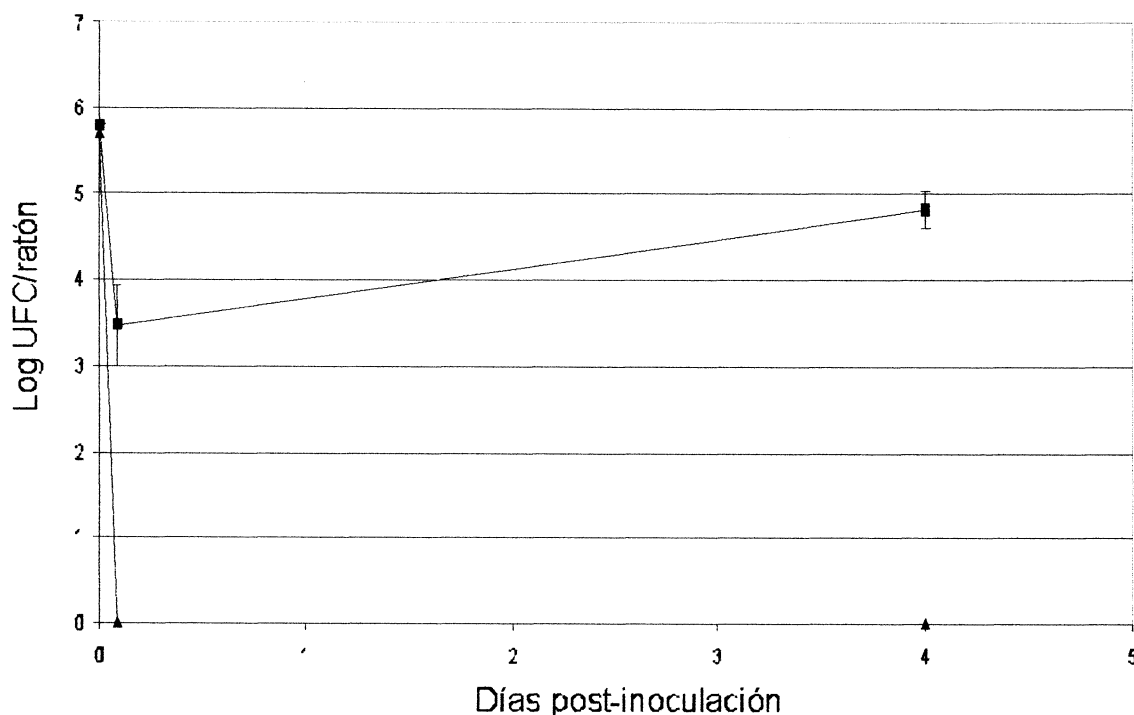
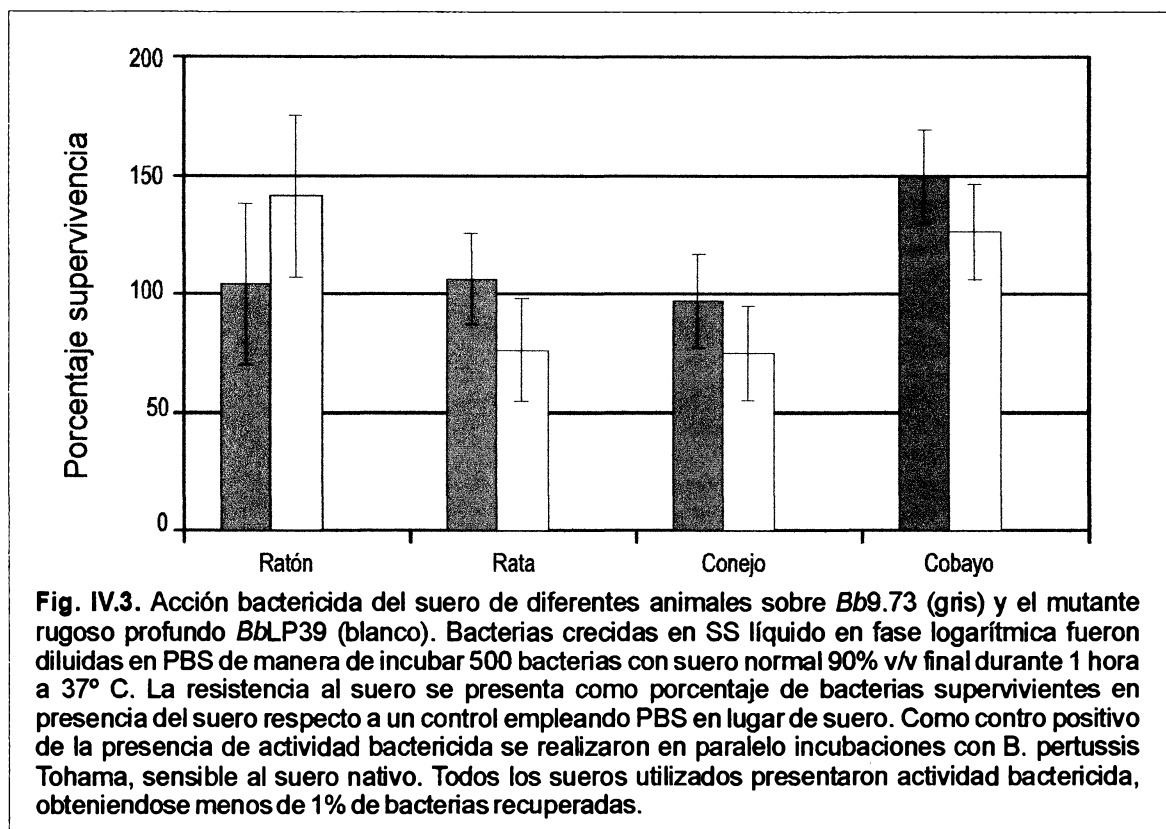


Fig. IV.2. Ensayos de infección *in vivo*. Ratones BALB/c hembras de 3 semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal con 50 μ l de aprox $4 \cdot 10^8$ de *Bb*9.73 en fase virulenta (■). Dos horas después de la primera infección los ratones fueron inoculados con $5 \cdot 10^4$ bacterias *Bb*GFP (A) (▼) o $5 \cdot 10^4$ bacterias *Bb*LP39 (B) (▲). En los días posteriores al momento de la inoculación indicados los ratones fueron sacrificados y se les extrajo quirúrgicamente ambos pulmones, los cuales fueron homogenizados. Para realizar el recuento de bacterias diluciones adecuadas del homogenado fueron sembradas en SSs y en SSs suplementado con Kanamicina (80 μ g ml^{-1}). Los valores de UFC representan el promedio de lo obtenido en ratones diferentes en cada punto.

Inoculación de ratones con *Bb*LP39 por vía intraperitoneal. Sensibilidad de *Bb*LP39 frente a la acción bactericida del suero. El proceso infectivo de *B. bronchiseptica* comienza con la adhesión sobre el tejido epitelial y luego se diseminaria sobre el resto de los tejidos presentes en el aparato respiratorio. En todos los ensayos anteriores se utilizó la vía de inoculación intranasal tradicional que a su vez es la que corresponde a la forma natural de infección. A través de esta vía, la bacteria entra en contacto directo con las células epiteliales debiendo adherirse a ellas para poder iniciar la infección. Este primer paso es el que estaría seriamente afectado en *Bb*LP39. Esta barrera en el desarrollo de la infección de *Bb*LP39 ha sido imposible de ser superada a través de las diferentes estrategias utilizadas anteriormente. Con el fin de lograr el desarrollo de la infección evadiendo el primer paso de adhesión, se decidió inocular a los ratones con la cepa *Bb*LP39 por otra vía diferente a la intranasal. Uno de los posibles inconvenientes de la vía intraperitoneal es la posible acción bactericida del suero, con el que la bacteria estaría en contacto en el sistema circulatorio. Con el fin de evaluar esta posibilidad se decidió realizar en primer lugar un ensayo de sensibilidad a la acción bactericida del suero. Para ello, suspensiones bacterianas provenientes de cultivos en medio líquido en fase logarítmica fueron diluidas de manera adecuada hasta obtener un

número aproximado de 500 bacterias. Esta cantidad ya ha sido ensayada y reportada como óptima por otros autores para la evaluación de la acción bactericida del suero (6). Esta suspensión bacteriana fue mezclada con un suero obtenido a partir de ratones BALB/c libres de patógenos, de manera de obtener una concentración del suero del 90%. Luego de la incubación de una hora a 37° C sin agitación, se sembraron diluciones de la mezcla bacterias-suero, en medio sólido SSs suplementados con antibióticos. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de bacterias sobrevivientes a la acción bactericida del suero para la cepa mutante *BbLP39* fue indistinguible al correspondiente a la cepa parental *Bb9.73*, indicando que ambas cepas son resistentes a la acción del suero nativo (Fig. IV.3). Como control de nuestro ensayo también realizamos incubaciones del suero con la cepa *B. pertussis* ya que se informó la acción bactericida del suero sobre esta cepa. Efectivamente, pudimos observar que *B. pertussis* es sensible a la acción del suero, permitiéndonos verificar que el suero empleado por nosotros tenía actividad bactericida. Estos resultados se repitieron al utilizar sueros nativos de otros hospedadores naturales de *B. bronchiseptica* tales como conejo, rata y cobayo.



Una vez determinada la resistencia de *BbLP39* a la acción bactericida del suero se procedió con la inoculación intraperitoneal en ratones una suspensión bacteriana del mutante *BbLP39*. Se inocularon intraperitonealmente ratones hembras BALB/c con $5 \cdot 10^5$ bacterias *BbLP39* en 200 μ l de PBS estéril. A los 4 días de la inoculación se sacrificaron los animales y se analizó la presencia de *BbLP39* en pulmón, tráquea, hígado y bazo. Los homogenados de cada uno de los órganos analizados se sembraron en SSs

suplementado con estreptomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y se incubaron a 37°C . En ninguno de los casos analizados pudimos observar crecimiento

Análisis de la modulación del LPS de *Bb9.73* durante ensayos *in vivo*

Tal como se ha discutido en el capítulo anterior, la falta de reactividad de los sueros provenientes de infecciones crónicas frente a las estructuras remanentes del LPS en el mutante *BbLP39* sugiere que la respuesta específica contra la porción distal del LPS sería la fuerza de selección del fenotipo rugoso profundo durante la infección. A fin de avanzar en el conocimiento de este aspecto modificamos el modelo de infección animal intentando recrear la situación inmune presente durante una infección crónica. Para ello realizamos los siguientes experimentos.

Inoculación de *Bb9.73* en ratones inmunizados con LPS liso. En primer lugar se intentó recrear la respuesta inmunológica contra el LPS con los integrantes tanto humorales como celulares de la misma. Para ello se inoculó intraperitonealmente LPS proveniente de la cepa *Bb9.73* según el esquema descrito en la sección 5.1. del presente capítulo. El título anti-LPS presente en el suero de los animales fue evaluado por ELISA semanalmente. Una vez alcanzado un título similar al presente en un suero de un ratón con una infección producida por *Bb9.73* con una antigüedad de más de 200 días ($1/300$, período crónico) se inocularon los ratones por vía intranasal con *Bb9.73* en fase virulenta ($5 \cdot 10^6$ UFC en $50 \mu\text{l}$ de PBS). El número de UFC recuperados de los pulmones de estos animales muestra un brusco descenso en los primeros 3 días postinfección. A partir de las pocas bacterias recuperadas a los cinco días después de la inoculación se analizó el perfil electroforético del LPS en geles de poliacrilamida (Fig. IV.4). Todos los aislamientos analizados no presentaron diferencias significativas respecto al perfil presente en el momento de la inoculación. En días posteriores no fue posible aislar

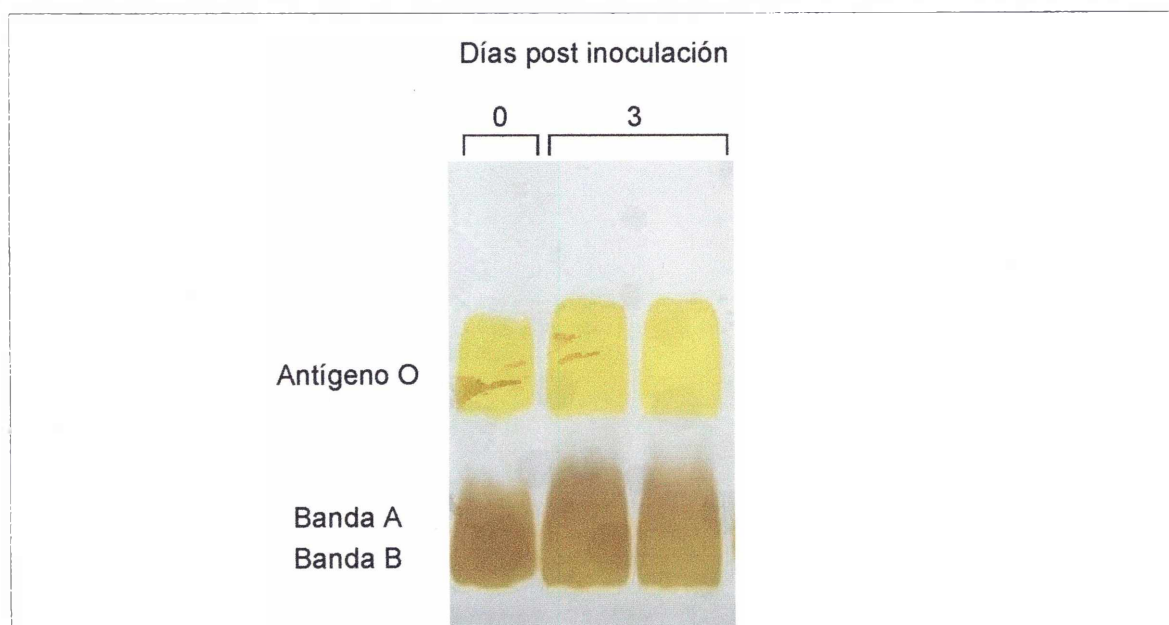
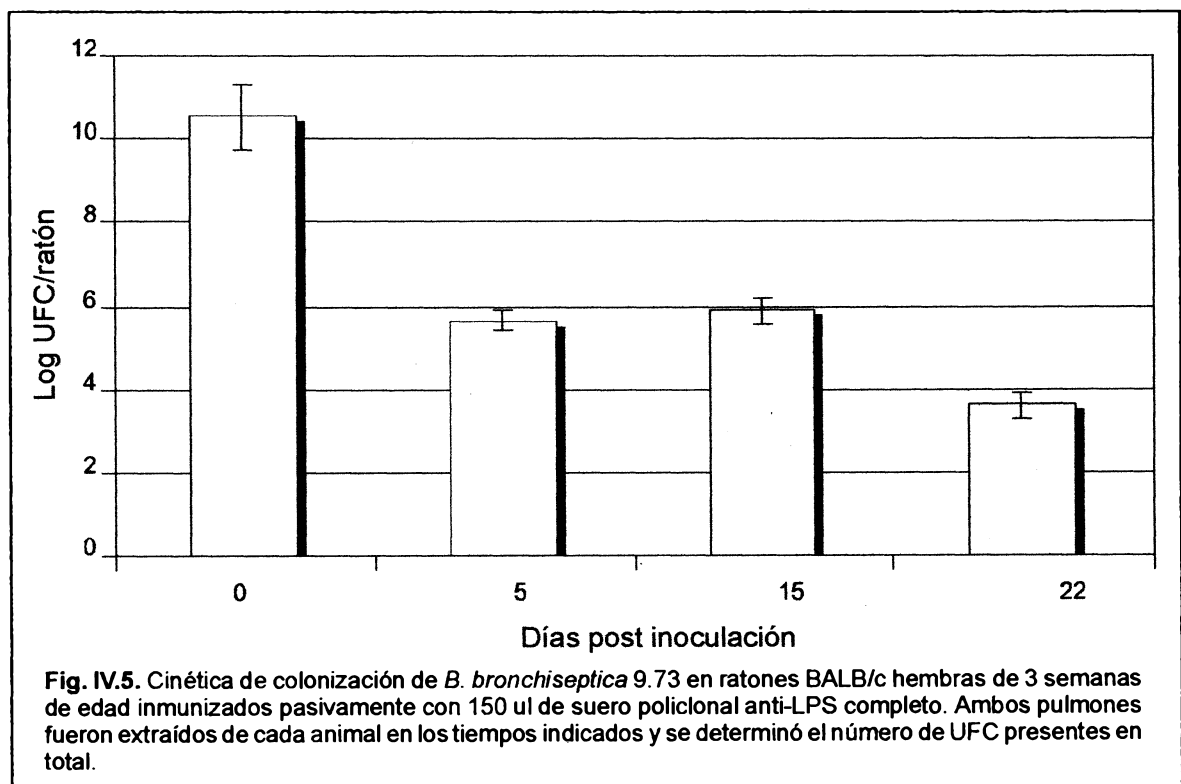


Fig. IV.4. SDS-PAGE 17,5% p/v de los LPS provenientes de las bacterias obtenidas a los distintos días después del momento de la inoculación con *Bb9.73* en ratones inmunizados previamente con LPS completo.

bacterias de los pulmones.

Transferencia pasiva de anticuerpos contra el LPS de *Bb9.73*. Para evaluar sólo el efecto de la respuesta humoral sobre la estructura del LPS se inocularon ratones que previamente habían sido inmunizados pasivamente con suero anti-LPS.

Para ello los animales fueron primeramente inyectados por vía intraperitoneal con suero policlonal específico contra el LPS de la cepa *Bb9.73* cuyo título fue de 1/5000. Transcurridas dos horas se inocularon los ratones con una suspensión bacteriana de *Bb9.73* en fase virulenta ($5 \cdot 10^6$ UFC en 50 μ l de PBS). En este momento se extrajo suero de los animales y se analizó el título de los mismos. Los títulos obtenidos se correspondieron con los del suero inoculado, indicando que la inmunidad humoral había sido transferida con éxito. Transcurridos 5, 15 y 22 días grupos de ratones fueron sacrificados. A partir de los pulmones de dichos ratones se determinó el número de bacterias viables por ratón y se analizó el LPS presente en las bacterias aisladas a partir de estos órganos (Figs. IV.5 y IV.6). La cepa que se utilizó para la inoculación presenta el perfil electroforético del LPS característico de esta cepa. Las bacterias aisladas durante los días el resto de los días postinoculación presentaron un LPS con estructura rugosa, es decir sin antígeno O.



DISCUSIÓN

En el capítulo anterior hemos descripto que el primer paso de la infección del mutante *BbLP39* está seriamente afectado debido a la ausencia de una estructura completa del LPS. Este comportamiento nos impidió analizar mediante los ensayos clásicos de infección en ratones, el rol de la estructura trunca del LPS en el establecimiento de una infección crónica. Con el fin de lograr que la infección de *BbLP39* progrese diseñamos una serie de estrategias. Por un lado empleamos cambios en las condiciones de inoculación: mayor volumen de inóculo, mayor cantidad de bacterias inoculadas, diferente vía de inoculación, y por otro lado utilizamos drogas inhibitoras del movimiento ciliar o traqueal (vía de entrada de *Bordetella*). Las modificaciones realizadas intentaron disminuir el efecto de alguno o varios de los obstáculos que encuentra la bacteria al intentar establecer la infección.

El aumento del volumen de inóculo permitiría que las bacterias presentes en la suspensión tengan acceso directo a la superficie del epitelio pulmonar. De esta manera las bacterias no deben sortear las etapas de diseminación a través del tracto respiratorio en donde podrían ser eliminadas por la respuesta innata allí presente. Con una idea similar se inoculó un número mayor de bacterias pretendiendo que de esta manera los otros componentes bacterianos en mayor cantidad suplan la deficiencia de *BbLP39*. Pero lamentablemente en ninguno de estos casos conseguimos que el mutante rugoso profundo colonizara los pulmones del ratón.

Se intentó entonces complementar la deficiencia del mutante para lo cual realizamos co infecciones en ratones con *BbLP39* y la cepa parental que se sabe que libera al medio extracelular al LPS en su forma completa. El LPS completo de *Bb9.73* liberado podría intervenir en procesos de adhesión entre el epitelio del hospedador y el mutante conteniendo al LPS rugoso profundo. Mientras que la cepa parental, marcada con el plásmido pGB5P1, colonizó y persistió en los pulmones del ratón al menos 4 días después del momento de la inoculación, no fue posible recuperar bacterias *BbLP39* transcurrido ese mismo lapso de tiempo (Fig. IV.2). La ausencia de complementación entre ambas cepas en los ensayos de coinoculación podría indicar, entre otras posibilidades, que la cepa *Bb9.73* no libera *in vivo* al LPS o que es necesaria una disposición espacial particular del LPS que no se alcanza cuando se encuentra en forma soluble. Más allá de la razón por la cual no se logra la complementación el hecho es que *BbLP39* no logra colonizar en el hospedador en esas condiciones.

Fue por ello que decidimos emplear otra estrategia y en particular una que bloquee la acción mecánica de las ciliadas presentes en el tracto respiratorio ya que son una de las principales causas de la eliminación de patógenos de este aparato. Se procedió entonces a la modificación de su actividad a través del uso de drogas que inhiben la movilidad de las ciliadas. Se utilizó para ello atropina, inhibidor del movimiento ciliar o un anestésico general como el pentobarbital. El uso de este último ya fue descripto en ensayos realizados con objetivos similares (4). El efecto de las drogas fue corroborado por la

sinomatología que desarrolla en los animales, sin embargo en estos ensayos los resultados fueron negativos ya que no se lograron recuperar colonias *BbLP39*.

Dado que no dió resultado manipular la actividad anti-adhesiva del hospedador, se decidió aumentar la posibilidad de adhesión del patógeno realizando inoculaciones de los ratones con bacterias cultivadas en condiciones en donde expresan más adhesinas. Register y colaboradores (2) le asignaron a proteínas codificadas por genes *vrg* una propiedad adhesiva que aumentaba la eficiencia de pegado de *B. bronchiseptica* a células epiteliales. Inoculamos entonces un grupo de ratones con *BbLP39* crecida en condiciones en que expresarían estas proteínas. En nuestro caso se utilizó el crecimiento a bajas temperaturas, reportada como la condición adecuada para expresar dichas adhesinas. Su expresión pudo observarse en geles de poliacrilamida. Sin embargo la posible actividad adhesiva adicional no fue suficiente para lograr revertir el fenotipo no infectivo de *BbLP39*.

El hecho de que ninguna de las estrategias utilizadas hasta aquí fueran suficientes para lograr que *BbLP39*, con un LPS rugoso profundo, infecte al ratón indicaría que quizás aunque pudiera superarse la etapa de adhesión otros mecanismos desarrollados por el hospedador impedirían de alguna manera que *BbLP39* progrese en la infección. Así, la acción bactericida del suero podría ser responsable de la eliminación temprana de *BbLP39*. Para evaluar este aspecto se realizaron ensayos en los que se incubaron las bacterias con sueros nativos de diferentes orígenes durante 1 hora a 37° C tal como fue realizado en otros trabajos por otros autores (6, 17). Los resultados indicaron que *BbLP39* no presenta diferencias de susceptibilidad respecto a la cepa parental, siendo ambas resistentes a la acción bactericida del suero. Este resultado resulta interesante, dado que varios trabajos en diferentes bacterias han atribuido al LPS como factor importante para prevenir la acción bactericida del suero (1, 15). En particular en *B. bronchiseptica* se ha sugerido que el antígeno O tendría el rol de evitar que el complemento presente en el suero sea activado (3). La diferencia entre estos resultados y los nuestros se debe quizás a que dichos autores trabajaron con mutantes en donde se comprometían zonas hidrofílicas del LPS. Estas zonas jugarían un rol particular en la resistencia al complemento. En nuestro caso, el LPS del mutante rugoso profundo *BbLP39* tendría en su composición sólo dos azúcares pertenecientes al core (KDO y Heptosa). La ausencia de la parte más hidrofílica del LPS comprendida por el antígeno O, el trisacárido y el core podría ocasionar cambios en cuanto a la hidrofobicidad y a la carga neta presente en la superficie de la membrana bacteriana. Estas diferencias respecto a la cepa con un LPS completo (hidrofílico y cargado en forma negativa) inhibirían una correcta aproximación y adhesión de los componentes del complemento impidiendo la acción de este sistema de defensa innato del hospedador.

Otro ensayo que realizamos consistió en inocular ratones neutropénicos ya que neutrófilos son los jugarían un rol importante contra el patógeno durante la infección de *B. bronchiseptica* (6). La neutropenia en los ratones se consiguió mediante el tratamiento de los ratones con ciclofosfamida. El recuento de células de la serie blanca tanto en el inicio de la infección como durante la misma nos permitió corroborar que durante todo el ensayo los ratones se encontraban en neutropenia. Nuevamente en estos ensayos fue imposible

lograr que *BbLP39* colonizara los pulmones de los ratones inoculados. Este resultado no indica que estas células no estén involucradas en el desarrollo de la inmunidad específica o adaptativa contra *B. bronchiseptica* sino que en este caso no sería necesaria la presencia de neutrófilos para erradicar la infección del mutante ya que éste no logra adherirse y colonizar al hospedador.

Ninguna de esta serie de manipulaciones permitieron que la infección de *BbLP39* avance hacia un estadio crónico de infección en el animal de experimentación. Si bien en todas ellas los resultados obtenidos fueron negativos, estos estaría reforzando el concepto de la necesidad de la presencia de un LPS completo para lograr una infección efectiva. La intervención del LPS en el proceso de adhesión sería fundamental para que se desarrollen las siguientes etapas de la infección.

Teniendo en cuenta la imposibilidad de lograr una infección efectiva por parte de *BbLP39* se decidió evaluar directamente si la presencia de una respuesta inmune anti-LPS que usualmente se encuentra en el período crónico de infección es la causante de inducir los cambios en el LPS desde una forma completa hacia una forma trunca. Para ello se indujo por un lado, el desarrollo de una inmunidad específica contra el LPS inyectando los ratones por vía intraperitoneal con LPS completo purificado a partir de la cepa *Bb9.73*. Se empleó una cantidad de LPS correspondiente 800 ng de KDO. Una vez verificado la presencia de un título de anticuerpos 1/300 se procedió a inocular los ratones. En esta situación logramos que sólo un número pequeño de bacterias colonizaran el pulmón quizás como consecuencia de que la repuesta inmune ya montada contra el LPS impide una correcta colonización de las bacterias presentes en el inóculo. De todas formas, a partir de la colonias recuperadas del pulmón a los cinco días después de la inoculación se procedió a la caracterización del LPS mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida. Ninguna de las colonias analizadas presentaba modificaciones en la estructura del LPS. A los diez días postinoculación este análisis no fue posible de repetir ya que no fue posible recuperar colonias de los pulmones de los ratones infectados.

La baja eficiencia en la colonización en la situación anterior pudo deberse a la respuesta celular y humoral desarrollada. Para mejorar la colonización pero manteniendo el entorno inmune característico del período crónico circunscribiéndonos los experimentos sólo a la respuesta humoral. Para ello realizamos una inmunización pasiva de los ratones con anticuerpos anti-LPS completo y sobre los ratones así inmunizados inoculamos bacterias conteniendo LPS completo (*Bb9.73*). Cuando comparamos la cinética de colonización de *Bb9.73* en estos ratones respecto a ratones no inmunizados pudimos verificar que el perfil de colonización no se modifica. Sin embargo pudimos observar claros cambios en las estructuras del LPS presentes en las bacterias recuperadas a lo largo de la infección. Los cambios observados se mantuvieron durante sucesivos repiques (entre dos o tres veces) de manera similar a lo observado en los aislamientos obtenidos del período crónico de una infección que no pierden el fenotipo rugoso.

El cambio estructural presente en estos aislamientos se corresponde a un fenotipo sin las porciones distales del LPS. En estos ensayos no se observó el fenotipo rugoso

profundo, en donde no sólo no se expresa el antígeno O sino que deja de ser sintetizado parte del core del LPS. La ausencia de este fenotipo puede ser atribuido a que en primer lugar el modelo de infección es con un hospedador diferente, por otro lado en esta oportunidad se evaluó sólo la acción de los anticuerpos anti-LPS y no la respuesta celular también presente en una infección. De todas maneras la pérdida del antígeno O observada como consecuencia de la presencia de anticuerpos anti-LPS puede ser que sea el primero de otros pasos que conducen finalmente hacia el fenotipo rugoso profundo. La selección de fenotipos rugosos quizás requiera tanto de la presencia de la inmunidad humoral como de la celular.

Referencias.

1. **Banemann A., Deppisch H. and Gross R. 1998.** The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 66:5607-12.
2. **Brockmeier S.L., Register K.B. 2000.** Effect of temperature modulation and bvg mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol.* 73:1-12.
3. **Burns V.C., Pishko E.J., Preston A., Maskell D.J., Harvill E.T. 2003.** Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
4. **Cotter P.A., Yuk M.H., Mattoo S., Akerley B.J., Boschwitz J., Relman D.A., Miller J.F. 1998.** Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 66:5921-5929.
5. **Gonzalez J.E., Reuhs B.L., Walker G.C. 1996.** Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8636-41.
6. **Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 1999.** Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun.* 67:6109-18.
7. **Herzenberg L.A. Weir D.M., Blacwell C. 1996.** Weir's Handbook of experimental Immunology. Blackwell Science, Inc., Cambridge Mass.;
8. **Hozbor D., Rodriguez M.E., Samo A., Lagares A., Yantorno O. 1993.** Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. *Res Microbiol.* 144:201-209.
9. **Janeway C. A. Jr. y Travers P. 1996.** Immunobiology. The Immune system in health and disease. Segunda Edición. Cuurent Biology Limited San Francisco y Fladelfia y Garland Publishing Inc Nueva York y Londres Capítulo 9. Host defense against infection.
10. **Karkhanis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J., Carlo D.J. 1978.** A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem.* 85:595-601.
11. **Kinnear S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. 2001.** Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun.* 69:1983-93.
12. **Melton A.R., Weiss A.A. 1989.** Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 171:6206-12.
13. **Paul W.E. 1998.** Fundamental Immunology. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pa.; Thomsom A. 1998. The Cytokine Handbok. Academic Press, Ltd. London, UK.
14. **Register K.B., Ackermann M.R. 1997.** A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infect Immun.* 65:5295-5300.
15. **Spears P.A., Temple L.M., Orndorff P.E. 2000.** A role for lipopolysaccharide in turkey tracheal colonization by *Bordetella avium* as demonstrated *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol.* 36:1425-35.
16. **Valverde C., Hozbor D.F., Lagares A. 1997.** Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques.* 22:230-2.
17. **West N.P., Jungnitz H., Fitter J.T., McArthur J.D., Guzman C.A., Walker M.J. 2000.** Role of phosphoglucosyltransferase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun.* 68:4673-80.

CAPÍTULO V

**Actividad proapoptótica de los LPS
obtenidos de bacterias aisladas
durante diferentes períodos de la
infección.**

INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores hemos descripto que el mutante *BbLP39*, que expresa un LPS con estructura rugosa profunda, no es capaz de iniciar el proceso de infección en el modelo murino. Esta deficiencia imposibilita que la infección progrese y en consecuencia *BbLP39* no resulta una herramienta adecuada para estudiar el rol de las diferentes estructuras del LPS durante distintos estadios de la infección y en particular durante el período crónico de la enfermedad. Como estrategia de estudio alternativa, decimos analizar a través de ensayos *in vitro* mecanismos que podrían estar ocurriendo *in vivo* durante la infección y en los que el LPS podría jugar un rol. En particular, analizamos el fenómeno de apoptosis o muerte celular programada ya que existe una creciente acumulación de evidencias acerca de la importancia de la misma en los procesos de patogénesis bacteriana. Estos patógenos pueden inducir o inhibir la apoptosis según la célula eucariota de que se trate y según el momento de la infección que se esté desarrollando (9, 22, 50). Para una mejor comprensión de nuestros resultados a continuación haré una breve descripción del proceso apoptótico y de los mecanismos involucrados en el mismo.

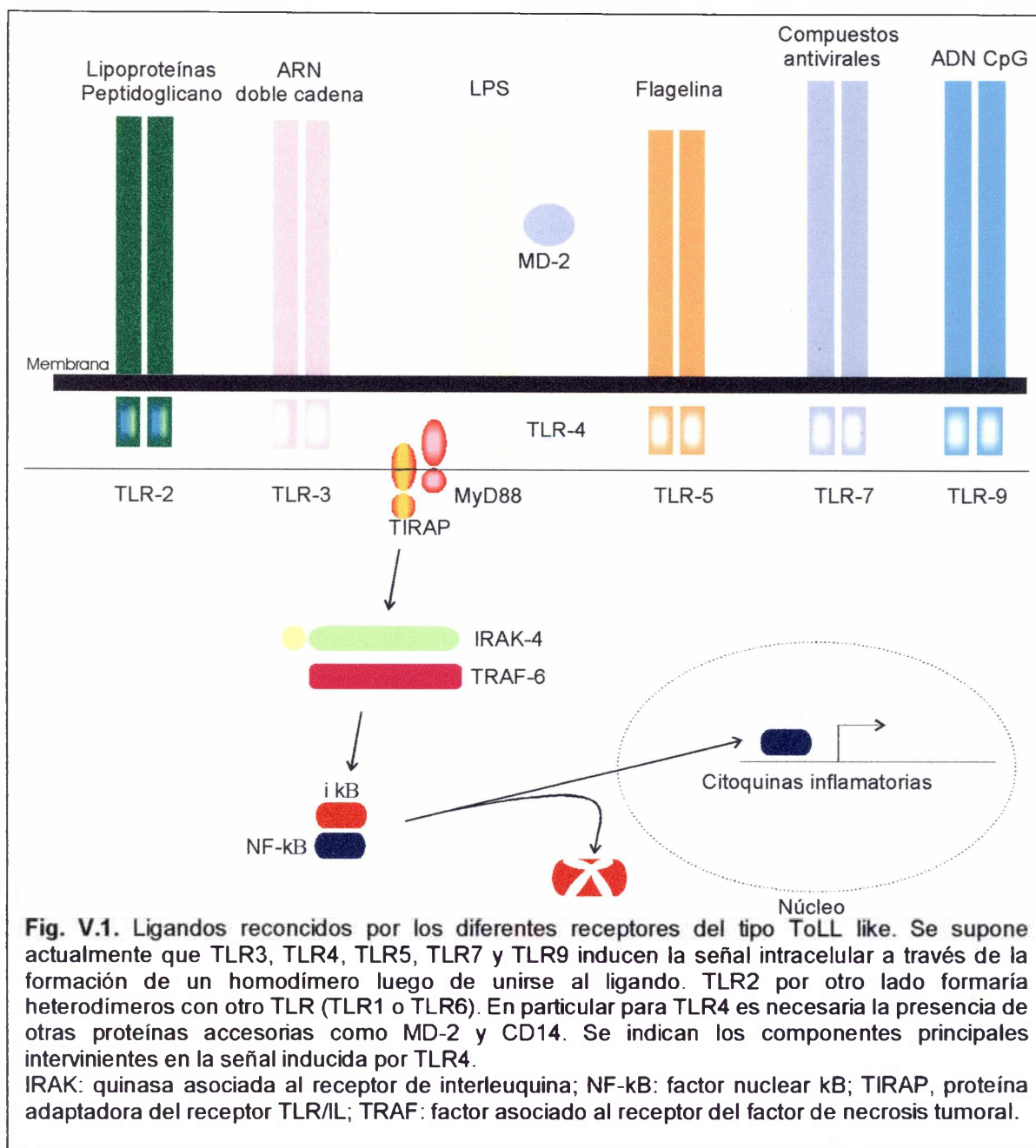
Apoptosis. Generalidades del proceso

La apoptosis es un proceso fisiológico normal en los organismos pluricelulares que, a diferencia de la necrosis, permite la eliminación de células dañadas sin generar una respuesta inmunológica exagerada. Se trata de un mecanismo evolutivamente conservado y regulado bioquímicamente y genéticamente que posee un rol crítico durante el desarrollo y homeostasis de los tejidos en organismos multicelulares (70). A diferencia de los procesos necróticos, la apoptosis permite al organismo remover las células innecesarias o dañadas de una manera inmunológicamente silenciosa. El proceso apoptótico puede desencadenarse a través de múltiples señales que pueden ser intra o extracelulares (69). Dentro de las señales intracelulares que desencadenan la apoptosis se encuentra la desnaturalización o ruptura de la estructura del ADN o una disminución dramática en los niveles de la relación ATP/ADP. Ambos procesos deben ser de una magnitud tal que resulte imposible para la célula revertir esa situación. El mecanismo por el cual estas alteraciones (desnaturalización/ruptura del ADN o desbalance energético) son sensadas parece involucrar a las mitocondrias de la célula (24) quienes en respuesta a estímulos liberarían al citosol citocromo c, cofactor necesario para la activación de algunas proteasas iniciadoras del proceso de apoptosis (23). Previamente a que se produzca esta liberación del citocromo c se observa un descenso en la diferencia de potencial en la membrana interna ($\Delta\psi_m$) de la mitocondria. Tanto la liberación de citocromo c como la disminución de $\Delta\psi_m$ se producen por mecanismos aún no del todo esclarecidos. Gottlieb (2000) (23), recientemente ha postulado diferentes mecanismos posibles para la liberación del citocromo c, sin embargo aún no existen evidencias experimentales contundentes que avalen algún mecanismo en particular (23).

En relación a las señales externas que desencadenan un proceso apoptótico se sabe que las mismas son diversas y que son recibidas por diferentes receptores. Por ejemplo, el factor antitumoral o factor de necrosis tumoral (TNF) que fue descrito como uno de los primeros inductores de apoptosis, ejerce su acción a través de dos receptores específicos presentes en la membrana celular. Estos dos receptores se han denominado TNF-R1 y TNF-R2, siendo el primero el responsable de la mayoría de las acciones biológicas observadas para TNF. La unión de TNF a su receptor, TNF-R1, desencadena una serie de señales intracelulares que finalmente resultan en la activación de dos factores de transcripción, el factor nuclear κ B (NF- κ B) y c-Jun (41). Estos factores de transcripción son responsables de la inducción de la expresión de diversos procesos biológicos que incluyen el crecimiento celular y la muerte celular programada.

Dentro de la familia integrada por receptores similares a TNF-R1 y TNF-R2 se encuentra el ligando de Fas (FasL) (26). Este ligando posee un rol central en la regulación fisiológica de la apoptosis (http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_9993) y ha sido implicado en el desarrollo de algunas enfermedades del sistema inmune. A pesar de que al sistema Fas-FasL se lo ha relacionado con señales de muerte, también produce señales de proliferación que aún no han sido estudiadas en detalle. La interacción de Fas o anticuerpos agonistas con FasL permite la formación de un complejo inductor de muerte (DISC) que recluta diferentes factores e inicia el proceso apoptótico (46).

Uno de los últimos receptores descritos con un rol en la inducción/prevención de la apoptosis en las células eucariotas son los receptores semejantes a Toll tipo 4 (*Toll-like receptors* 4) (TLR4) (2). Este receptor está involucrado en el reconocimiento de patógenos por parte de la respuesta inmune innata del hospedador y se encuentra presente en varios tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células endoteliales pero no en linfocitos (52, 57). A diferencia del resto de los receptores Toll-like (TLR1-2, TLR5-9 y TLRx), el TLR4 presenta afinidad por el lipopolisacárido (LPS) presente en todas las bacterias Gram negativas (Fig. V.1) (2, 8, 39). Esta interacción ligando-receptor permitiría al organismo identificar la presencia de este tipo de patógenos de una manera relativamente específica y disparar así la respuesta inmune. Este receptor, luego de reconocer la presencia del LPS, induce la translocación de NF- κ B al núcleo de la célula, a través de una cascada de señales en las que estarían involucradas diferentes proteinquinasas (ej: la quinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK) (40). Normalmente el factor NF- κ B se encuentra en el citoplasma de la célula eucariota unido de manera no covalente a otras proteínas chaperonas ($\text{I}\kappa\text{B}$ entre otras) impidiendo que pueda ser translocado al interior del núcleo (7). Ante la presencia de un estímulo apoptótico y/o inflamatorio, las chaperonas son ubiquitinadas y posteriormente degradadas, lo que le permite a NF- κ B ingresar al núcleo y activar la transcripción de numerosos genes involucrados en su mayoría en procesos anti-apoptóticos y en el desencadenamiento de la respuesta inmune (16).



Todos estos receptores involucrados en la apoptosis, en respuesta a la presencia de los ligandos señal, se reclutan en la membrana de manera de activar a una serie de enzimas denominadas caspasas. Estas enzimas proteolíticas se caracterizan por (:) ser cisteín proteasas y por lo tanto utilizan a la cisteína como grupo nucleofílico en su sitio activo y (:) cortar al péptido dando como resultado otro de menor tamaño cuyo extremo C-terminal es un ácido aspártico y por ello el nombre de aspapas (4). El rol de estas enzimas en la apoptosis se ha determinado, por un lado, a través del uso de inhibidores sintéticos o naturales específicos de las caspasas que son capaces de prevenir la apoptosis ante estímulos que

normalmente inducen este proceso (19) y por otro lado, a través de animales que no poseen determinadas caspasas causando serios defectos en las apoptosis (10).

Las caspasas son sintetizadas como precursores o procaspasas que luego son convertidas en proteasas activas por mecanismos proteolíticos. Esta proteólisis ocurre en residuos de ácido aspartico iguales a los que la misma proteasa reconoce como sustrato, por lo que las caspasas funcionarían en forma de cascada. En esta cascada existe una caspasa iniciadora que es activada por la interacción con proteínas adaptadoras, mediante un proceso clave en la regulación de la apoptosis y por lo tanto cuidadosamente controlado. Luego de activada la caspasa iniciadora, ésta activa una diversidad de caspasas efectoras que a su vez actuarán sobre otras caspasas y demás proteínas de la célula, que finalmente llevarán a la muerte celular programada (10).

Una vez desencadenado el proceso apoptótico éste es irreversible. Una célula que ha iniciado el proceso de apoptosis se caracteriza por presentar marcados cambios bioquímicos y morfológicos. Entre los primeros se destacan una fragmentación discreta del ADN de la célula debido al clivaje de esta molécula entre los nucleosomas, la exposición de fosfatidilserina hacia el medio extracelular y un controlado clivaje de varias proteínas del citosol, entre ellas la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), involucrada en la identificación de las zonas degradadas del ADN nuclear (14, 10, 49, 74).

Los estudios sobre apoptosis han demostrado que sobre la diversidad de factores y vías que lo desencadenan existen numerosas características que son comunes y es sobre ellas que se han desarrollado diferentes métodos para detectar y/o cuantificar la presencia de células en procesos de muerte celular programada. En la tabla V.1 se muestra un resumen de los principales métodos y sus características más sobresalientes.

Tabla V.1: Metodologías empleadas para la detección de células apoptóticas.

Método	Fundamento	Cuantificación	Estadio detectado	Célula blanco	Comentarios
Hoechst o DAPI	Unión a ADN	No	Tardío	Todo tipo	No es específico
Naranja de acridina, Bromuro de etidio	Se une al ADN	Por citometría de flujo	Tardío	Células en suspensión	No es específico. Sólo distingue entre célula viva o muerta
TUNEL	Detecta las porciones clivadas del ADN	Si	Tardío	Células en suspensión y tejidos	
Laddering	Detección de oligonucleosomas	No	Tardío	Todo tipo de muestras	Poca sensibilidad
ELISA	Detección de oligonucleosomas	Si	Tardío	Células en suspensión o adheridas	Utilizado en esta Tesis
Clivaje de procaspasas	Detección por <i>western blot</i>	No	Temprano	Todo tipo de muestras	Poca estabilidad de los anticuerpos
Clivaje de sustratos de caspasas (PARP,	Detección por <i>western blot</i>	No	Tardío	Todo tipo de muestras	

procaspasa 3)					
Anexina V	Detecta la inversión de fosfatidilserina en la membrana plasmática	Por citometría de flujo	Temprano	Sin trataminetos de fijación	Permite el procesamiento rápido de las muestras Utilizado en esta Tesis
Caspasas	Sustrato cromóforo	Si	Temprano-intermedio	Células en suspensión o adheridas	Bajo nivel de detección
Pérdida de $\Delta\psi_m$	Se utilizan fluorocromos	Si	Temprano	Células en suspensión o adheridas	Se debe procesar rápidamente
Liberación de proteínas de la mitocondria		No	Temprano	Todo tipo de muestra	Se debe hacer fraccionamiento celular, lo cual diluye la señal
Inhibidores de caspasas		No	No se determina	Células en suspensión o adheridas	Se necesita un método adicional para detectar la pérdida del efecto apoptótico. Están disueltos en DMSO que es tóxico para la célula

Apoptosis en la infección bacteriana

A través de la utilización de las técnicas descriptas en la tabla se pudo determinar la importancia de la apoptosis en la infección bacteriana. Más aún, se han podido identificar a numerosos factores bacterianos que son capaces de inducir o inhibir el proceso apoptótico (22, 50). Esta actividad y la regulación de la misma se hace evidente sobre todo en aquellas bacterias que presentan una etapa de vida intracelular en el proceso infectivo, pero no es exclusiva de este tipo de patógenos (9, 22, 50). En la actualidad existen numerosos reportes no sólo sobre el rol de distintos componentes bacterianos en la apoptosis de diferentes células del hospedador sino sobre los mecanismos involucrados (9, 50). En la Tabla V.2 y la figura V.2 se presenta un esquema con los mecanismos hasta el momento conocidos de modulación del proceso apoptótico por parte de algunos patógenos bacterianos.

Tabla V.2. Mecanismos a través de los cuales diferentes patógenos modulan la actividad apoptótica de células eucariotas.

Microorganismo	Factor bacteriano involucrado	Célula del hospedador	Sitio de acción	Efecto sobre el mecanismo apoptótico	Referencia
<i>Brucella suis</i>	Factor soluble	Monocitos y macrófagos	Desconocido	Inhibición	25
<i>Chlamydia trachomatis</i>	¿?	Células epiteliales, macrófagos	Caspasa 3, cyt c	Inducción e inhibición	15, 59
<i>Coxiella sp.</i>	¿?	Macrófagos	TNF- α	Inducción	12
<i>Helicobacter pylori</i>	Factor proteico	Células	Caspasa 8 y 9,	Inducción	68

	de membrana. LPS	epiteliales gástricas	Bad, Bid.		
<i>Legionella pneumophila</i>	Factor regulado por el sistema de virulencia <i>dot/icm</i> .	Macrófagos, células epiteliales	Caspasa 3	Inducción	20, 21 56
<i>Listeria monocytogenes</i>	Llyo	Hepatocitos, células dendríticas, linfocitos	Desconocido	Inducción	30, 53, 63
<i>Mycobacterium sp.</i>	Pared celular.	Macrófagos	TNF- α , Caspasa 1	Inducción e inhibición	3, 6, 43, 48, 64, 65, 72
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	LPS	Células del bazo, linfocitos B	TNF- α	Inducción	37
<i>Rickettsia sp.</i>	¿?	Células epiteliales	NF- κ B	Inducción e inhibición	11
<i>Salmonella spp.</i>	SipB	Macrófagos	Caspasa 1	Inducción	33, 62
<i>Shigella flexneri</i>	IpaB	Macrófagos	Caspasa 1	Inducción	35, 78
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YopJ/YopP	Macrófagos	NF- κ B, TNF- α , MAPKK	Inducción	54, 55, 60, 66

En la tabla V.2 se puede apreciar que cada patógeno utiliza diferentes mecanismos para regular la apoptosis celular. El grado de avance en el conocimiento sobre apoptosis permite realizar por el momento suposiciones acerca del rol específico de la inducción o inhibición del proceso apoptótico en la célula del hospedador. La inducción podría contribuir a la eliminación de células clave del hospedador que serían necesarias para la erradicación del patógeno, inhibir su replicación, liberar al exterior las bacterias intracelulares o inducir una respuesta inflamatoria no demasiado exagerada que permita controlar la infección. Por otro lado la inhibición de la muerte celular permitiría a las bacterias intracelulares conservar su nicho, persistiendo de esta manera en el hospedador. La determinación de la relevancia de la inducción o prevención de la apoptosis durante la infección no sólo permitirá avanzar en la comprensión del proceso patogénico sino que aportará información sobre la compleja relación patógeno-hospedador.

Apoptosis en la infección causada por *Bordetella*

A lo largo del estudio de los diferentes factores de virulencia presentes en el género *Bordetella*, se ha determinado que alguno de ellos poseen actividad apoptótica en algunos tipos celulares (44, 75). A su vez ha sido posible, en ocasiones, observar *in vivo* un aumento significativo en el número de células en proceso de muerte celular programada durante la infección de *Bordetella* en modelos de infección murinos. La mayoría de estos estudios se han focalizado en *B. pertussis* y de allí se extendieron a las otras especies del género. La extrapolación de resultados entre especies ha sido denominador común a lo largo del estudio

de este género. Sin embargo, dichas extrapolaciones no son siempre válidas partiendo de la base de la divergencia de hospedadores que existe entre ambas especies.

Los primeros reportes acerca de la actividad apoptótica presentada por *B. pertussis* asignaron a la adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly) el rol principal en la inducción del proceso (44, 45). Esta toxina purificada puede inducir la fragmentación del ADN al tratar las células J774A.1. Para ello, la toxina requiere de sus dos actividades. adenil ciclasa y hemolisina, además su modificación post traduccional (adición de un residuo del ácido palmitico en la Lys₉₈₃ de la cadena peptídica) (45). Se ha sugerido que la actividad apoptótica de AC-Hly estaría relacionada con el aumento en AMP_c junto con la disminución de ATP producida por esta toxina en el medio intracelular (5). La disminución de ATP ha sido descrita como poderoso inductor de apoptosis (51), principalmente en donde se encuentra involucrado un descenso en el potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\Psi_m$). En efecto, durante la apoptosis inducida por *B. pertussis* se puede observar, junto al descenso de ATP, una disminución del $\Delta\Psi_m$ de esta organela (5). En forma adicional se presenta una disminución en la célula eucariota en el nivel de expresión de Hsp70, chaperona involucrada en la prevención de la inducción de apoptosis debida a descensos en los niveles de ATP (58).

La actividad proapoptótica descrita para otros factores de virulencia distintos de AC-Hly como FHA presenta aún controversias. Khelef y colaboradores (1993) (45) no encontraron fragmentación de ADN en las células tratadas con esta adhesina, sin embargo Abramson y col. (2001) (1) observaron un importante efecto inductor de apoptosis con el agregado de FHA mediante técnicas más sensibles como clivaje de proteínas como poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y detección de los oligonucleosomas liberados (1). Las diferencias entre ambos trabajos pueden explicarse en base a diferencias en las células eucariotas utilizadas. No fue posible observar apoptosis en células J7741A.1 (macrófagos) pero sí en U937 y THP-1 (derivadas de monocitos) y BEAS2-B (derivada de epitelio bronquial). En los casos en que se observaron células en procesos apoptóticos, se determinó que el mecanismo de inducción de FHA involucra de algún modo al receptor para TNF, TNFR1 (1) y/o la secuencia RGD presente en FHA. Este tripéptido sería reconocido por la integrina de membrana VLA-5 que induce la traslocación de NF- κ B al núcleo provocando un aumento de la molécula de adhesión 1 (ICAM-1) que es inductor de acumulación leucocitaria.

B. bronchiseptica también produce apoptosis en células eucariotas, en particular en las derivadas de macrófagos murinos (RAW264.7) (17). Bacterias deficientes en la expresión de adhesinas como pertactina o variantes de fase avirulentas no producen apoptosis *in vitro* salvo que se favorezca el proceso de adhesión mediante la centrifugación de las bacterias sobre las células eucariotas. Esto indicaría que es necesario un primer paso de adhesión a fin de que los factores involucrados en la inducción puedan actuar sobre la célula blanco. Por otro lado ha sido posible identificar un sistema de secreción tipo III en *B. bronchiseptica* (75), el cual estaría involucrado en la inducción de apoptosis.

En la siguiente tabla se presentan a modo de resumen los resultados publicados hasta el momento sobre un conjunto de componentes de *Bordetella* que inducen apoptosis sobre distintas células a través de diversos mecanismos.

Tabla V.3. Componentes de *Bordetella* spp con capacidad para inducir la apoptosis de células eucariotas.

Factor ensayado	Tipo celular utilizado	Método de detección	Referencia
Ensayos en los que se observó inducción de apoptosis			
Ensayos <i>in vitro</i>			
<i>B. pertussis</i>			
Célula entera	Monocitos (donadores sanos)	$\Delta\Psi$	5
Adenilato ciclasa	Macrófagos (J774A.1)	Fragmentación de ADN	45
	Monocitos (donadores sanos)	$\Delta\Psi$	5
FHA	Monocitos (U937)	Anexina V-FACS TUNEL	1
<i>B. bronchiseptica</i>			
Célula entera (PRN)	Macrófagos (RAW264.7)	Anexina V-FACS Anexina V-Microscopía	17
Célula entera (Sis. Sec. Tipo III)	Macrófagos (J774A.1)	TUNEL	76
	Células epiteliales pulmonares (L2)	Inhibición de la traslocación nuclear de NF- κ B	76
Ensayos <i>in vivo</i>			
<i>B. pertussis</i>			
Célula entera	Líquido broncoalveolar (neutrófilos y macrófagos)	TUNEL	28
<i>B. bronchiseptica</i>			
Célula entera	Tejido pulmonar (células infiltrativas)	TUNEL	31, 76
Ensayos en donde no se observó un aumento en la población celular apoptótica			
Ensayos <i>in vitro</i>			
<i>B. pertussis</i>			
PRN, FHA o PT	Macrófagos (J774A.1)	Fragmentación de ADN	45
Lipopolisacárido	Monocitos (U937)	Anexina V-FACS TUNEL	1
Ensayos <i>in vivo</i>			
<i>B. pertussis</i>			
Célula entera	Tejido pulmonar (células infiltrativas)	TUNEL	31

Abreviaciones: diferencia de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), Flow citometric analysis (FACS), deoxy-nucleotidyl transferas-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).

A fin de determinar si la actividad apoptótica inducida *in vitro* tanto por *B. pertussis* como por *B. bronchiseptica* ocurre también *in vivo*, varios autores analizaron la presencia de cuerpos apoptóticos durante la infección en modelos murinos (28, 31). En el estudio realizado por Gueirard y col. (1998) (28) sobre líquido broncoalveolar del ratón infectado con *B. pertussis* se observa un aumento significativo en el número de células apoptóticas, tanto en

neutrófilos como macrófagos. Sin embargo, Harvill (1999) (31) no observó cuerpos apoptóticos en el pulmón de un ratón infectado con *B. pertussis*, a pesar de que sí lo ha hecho en ratones infectados por *B. bronchiseptica*. En este último caso las células apoptosadas eran células infiltrativas; sólo en raras ocasiones se pudieron observar células epiteliales apoptóticas. Es importante recordar que el ratón no es el hospedador natural de *B. pertussis* por lo que es necesario emplear un número importante de bacterias en los inóculos a fin de lograr que la infección se desarrolle. En el trabajo que no observa células apoptóticas justamente se utilizó un número diez veces menor ($5 \cdot 10^5$ UFC) al empleado por el otro grupo ($5 \cdot 10^6$ UFC). Esta diferencia en el número de bacterias inoculadas podría explicar las diferencias observadas.

Más allá de la falta de un conocimiento acabado sobre la apoptosis, es esperable que a lo largo de un proceso crónico de infección un patógeno intracelular prevenga el desarrollo de un proceso apoptótico en las células que lo alojan. En concordancia con esta suposición, en el caso de *B. bronchiseptica*, de sabida capacidad invasiva, se observó que los aislamientos obtenidos durante el período crónico presentaban una disminución en los niveles de expresión de varios factores de virulencia como PRN, FHA y AC-Hly (30) que han sido asociados a procesos apoptóticos. Esta regulación de la expresión podría obedecer a una necesidad de preservar el entorno intracelular donde la bacteria persistiría durante el proceso crónico. Otro de los cambios observados en este periodo, además de la regulación de los factores de naturaleza proteica, es la variación de la estructura del lipopolisacárido (LPS) hacia un fenotipo rugoso profundo ya descrito en anteriores capítulos de esta tesis. Si bien pequeñas ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) cantidades de LPS proveniente de *B. pertussis* no presentaron actividad apoptótica en células derivadas de monocitos (1), el efecto del LPS de *B. bronchiseptica* ya sea en su fenotipo liso o trunco no ha sido aún reportado. Esta variación podría acompañar a la disminución en la expresión de proteínas proapoptóticas de manera de prevenir la muerte de la célula en donde persistiría intracelularmente. Con el fin de analizar las posibles actividades apoptóticas presentadas por el LPS en su forma completa (lípidos A-core-trisacárido-antígeno O) o en su forma trunca (lípidos A-KDO) realizamos ensayos de apoptosis sobre células en cultivo derivadas de aquellos tipos celulares que se encuentran en íntimo contacto con el patógeno a lo largo de la infección. Analizamos también la actividad apoptótica de los LPS presentes en los aislamientos obtenidos en las infecciones de *B. bronchiseptica* producidas en humanos a fin de observar si existen actividades diferenciales que podrían justificar el cambio observado en la estructura del LPS.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes: *Bb9.73*, *BbLP39*, *BbR1* y *BbR4* y se describen en las Tablas II.1 y III.2. Los cultivos se realizaron según se describió en la página 63 de este trabajo de tesis. Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada y estéril. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) estreptomycin 200 (Sm) y kanamicina sulfato (Km) 80.

2. Aislamiento del lipopolisacárido de *Bordetella* y análisis en geles de SDS-PAGE

Los lipopolisacáridos de las cepas fueron purificados según se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II de esta Tesis, con algunas modificaciones a fin de garantizar la ausencia de proteínas en las preparaciones. En esta oportunidad en la etapa final de la preparación del LPS, se agregaron 50 μl de buffer de Laemmli 1X sin el agregado del colorante azul de bromofenol ni de β -mercaptoetanol. Las muestras conteniendo el LPS fueron calentadas en agua a ebullición durante 10 minutos y luego se sonicaron durante 15 minutos a fin de desagregar el LPS. A las muestras así obtenidas se las sometió a una digestión con pronasa ($2,5 \text{ mg ml}^{-1}$) durante toda la noche a 37°C . Todas las preparaciones de LPS así obtenidas fueron conservadas hasta el momento de su utilización a -20°C .

Las preparaciones de LPS se analizaron mediante corridas electroforéticas en SDS-PAGE 18% p/ven cubas electroforéticas miniprotean II (Bio-Rad). La tinción de los LPS fue realizada de la misma manera que se describió en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II de este trabajo (pág. 64).

3. Determinación de la presencia de proteínas proapoptóticas en los preparados de LPS mediante inmunoensayos (*Western blot*)

Para determinar si en las preparaciones de LPS obtenidas por nosotros está presente una de las proteínas más caracterizadas como apoptóticas, la AC-Hly, se realizaron inmunoensayos de dichas preparaciones empleando como primer anticuerpo un suero policlonal que reconoce a AC-Hly de *Bb9.73*. Este suero fue obtenido por nosotros a partir de la toxina purificada según se describe en el punto 5 de esta sección. Para ello se inocularon por vía intraperitoneal tres ratones BALB/c con $0,1 \mu\text{g}$ de AC-Hly purificada. La primera inoculación se realizó con adyuvante de Freund completo y luego se repitieron las inmunizaciones por la misma vía a los 15 y 21 días con la misma cantidad de AC-Hly pero adyuvante de Freund incompleto. Luego de 7 días de la última inmunización se extrajo sangre para evaluar la presencia de anticuerpos y luego una vez confirmada la presencia de los mismos se procedió a extraer a blanco la sangre de los ratones para obtener el suero.

Para analizar la presencia de AC-Hly en nuestras preparaciones de LPS se realizó una corrida electroforética de las muestras y una transferencia de dicho gel a membranas de PVDF (Immobilon™, Millipore) mediante el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante como hemos detallado en capítulos anteriores. Estas membranas fueron incubadas con el suero anti-AC-Hly en una dilución 1:1000, luego de haber sido bloqueada con proteínas de la leche descremada. Para revelar la membrana empleamos como segundo anticuerpo a un anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Dilución 1:1000, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc) y como sustrato empleamos nitroblue tetrazolium chloride (NBT 75 mg ml⁻¹ de 70% v/v dimetilformamida, Life Technologies,) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato-p-toluidina (BCIP, 50 mg ml⁻¹ de dimetilformamida, Life Technologies). En paralelo se determinó si la mínima cantidad de AC-Hly detectable por westernblot inducía apoptosis. La metodología seguida en este caso se describe más abajo.

4. Obtención de AC-Hly de *B. bronchiseptica* mediante una cromatografía de afinidad en sistema batch

Para la obtención de AC-Hly se partió de un cultivo de *B. bronchiseptica* en fase logarítmica (aprox. 12 horas de incubación). El medio de cultivo empleado fue el medio

sintético de Stainer Scholte. Se midió la D.O._{650nm} y se calculó el peso en gramos de bacterias presentes en el cultivo mediante la siguiente fórmula: $C(g\ l^{-1}) = 0,197 + 0,05814 \cdot D.O._{650nm} + 0,22873 \cdot (D.O._{650nm})^2$. Se centrifugó la suspensión bacteriana a 16000 X g durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8 conteniendo CaCl₂ 2,2 mM y Urea 5 M de manera de agregar 20 ml de solución cada 4 gramos de bacteria. En presencia de esta solución, las células bacterianas se incubaron durante una hora a 4° C con agitación suave. Luego se centrifugó a 16000 X g durante 30 minutos a 4° C. Se tomó el sobrenadante y se agregaron cada 20 ml, 60 ml de CaCl₂ 0,22 mM Tris-HCl pH 8 y 600 µl de calmodulina-agarosa (Sigma™). Se incubó la mezcla durante toda la noche a 4° C con agitación. Se centrifugó la mezcla 5 minutos a 13000 X g y se lavó la resina (calmodulina-agarosa + AC-Hly) 2 veces con CaCl₂ 0,22 mM Tris-HCl pH 8, una vez con 0,5 M NaCl CaCl₂ 0,22 mM Tris-HCl pH 8 y nuevamente dos veces con CaCl₂ 0,22 mM Tris-HCl pH 8. Finalmente se incubó el gel con Urea 8 M + CaCl₂ 2,2 mM Tris-HCl pH 8 una hora a temperatura ambiente, se centrifugó 5 minutos a 13000 X g. El sobrenadante así obtenido conteniendo la toxina se conservó a -20° C hasta el momento del ensayo. El lapso de tiempo entre la obtención de la toxina y la realización del ensayo nunca superó los siete días para evitar problemas por degradación proteica.

5. Determinación de KDO presente en los preparados de LPS

Para determinar la cantidad de LPS en nuestras preparaciones se realizó la determinación del ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO) ya que es un componente ubicuo del LPS. Para

ello se utilizó la técnica descrita por Karkhanis y col. (1978) (42) tal como ya ha sido descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo III, página 95.

6. Ensayos de inducción de apoptosis con los preparados de LPS

Para los ensayos de apoptosis se utilizaron por un lado células derivadas de epitelio pulmonar humano A549 (ATCC CCL185) y células derivadas de macrófagos U937 (ATCC CRL15932), las cuales fueron cultivadas en el medio Eagle modificado por Dulbecco (Laboratorios Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, estreptomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) hasta obtener un 70-80% de confluencia en el caso de A549 y aproximadamente $1 \cdot 10^5$ células ml^{-1} en el caso de U937. Para los ensayos de apoptosis se sembraron placas de cultivo Nuncion Delta (Nunc, Roskilde, Denmark) de 24 pocillos (well) con aproximadamente $8 \cdot 10^4$ células por pocillo 18 horas antes de cada ensayo.

Por otro lado, empleamos monocitos y neutrófilos que se purificaron a partir de sangre total de donadores sanos voluntarios. La purificación se realizó a través de un gradiente de Ficoll-Histopaque®-1119/ Histopaque®-1077. Brevemente, 3 ml de Histopaque®-1119 se agregaron en un tubo cónico a los que luego se agregaron cuidadosamente 3 ml de Histopaque®-1077 y 6 ml de sangre anticoagulada con heparina (5 μl cada 10 ml de sangre). Toda esta preparación fue centrifugada a $700 \times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente con aceleración inicial máxima y sin desaceleración final. Las porciones correspondientes a los granulocitos y a las células mononucleares se tomaron con una pipeta Pasteur y se trasvasaron a placas de cultivo Nuncion Delta (Nunc, Roskilde, Denmark) a fin de permitir la adhesión de los monocitos para lo cual se incubó durante 2 horas en. Las células así obtenidas se lavaron con PBS tres veces. En todos los casos previo a la realización de los ensayos se verificó mediante coloración vital con Tripan Blue que la población de células muertas no excediera el 3% de la población total. Diluciones adecuadas de cada una de las preparaciones de LPS fueron agregados a $5 \cdot 10^5$ de las células a ensayar distribuidas cada una en diferentes placas. En paralelo se realizaron controles negativos empleando sólo buffer de Laemmli diluido carente de LPS. Como control positivo se utilizó tanto a la AC-Hly ya descrita con actividad proapoptótica (26) como a una suspensión de *B. bronchiseptica* en fase virulenta en una relación bacteria:célula eucariota 100:1 (17, 31). Las suspensiones celulares junto con las muestras a ensayar fueron incubadas a 37°C y 5% CO_2 durante cuatro horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a determinar presencia de células en proceso apoptótico siguiendo los procedimientos que se detallan a continuación:

6.1. Cell Death Detection ELISA^{PLUS} de RocheTM. Las células luego de ser incubadas con las preparaciones de LPS, AC-Hly o la suspensión bacteriana se centrifugaron durante 10 minutos a $200 \times g$. En los casos en que se analizó la inducción de necrosis se guardó el sobrenadante a $2-8^\circ\text{C}$. En caso contrario el sobrenadante fue descartado. Luego las células

se resuspendieron en buffer de lisis provisto por el fabricante y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 200 X g. Un volumen de 20 µl del sobrenadante obtenido o del reservado para el análisis de la necrosis fueron agregados a las fosas recubiertas con estreptoavidina. Se agregaron 80 µl del inmunoreactivo anti-histona biotilado + anti ADN con peroxidasa conjugada, y se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación (300 rpm). Se lavaron las fosas 3 veces con 300 µl de buffer de incubación y se agregó 100 µl de la solución con el sustrato para peroxidasa, proporcionada por el fabricante. Se permitió el desarrollo de color durante 20 minutos en la oscuridad para luego determinar la absorbancia a 405nm (λ referencia 490nm) en lector para placas de ELISA (Rainbow Tecan Spectra). Con los valores obtenidos se calculó el factor de enriquecimiento de la siguiente manera: $FE = (\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco Reactivo}) / (\text{Abs. células sin agregado de inductor} - \text{Abs. Blanco Reactivo})$.

6.2. Annexin-V-Fluos Staining Kit de Roche. Una vez cumplido el tiempo de incubación de las células junto a las preparaciones de LPS, se lavaron las células con PBS estéril dos veces centrifugando a 200 X g durante 5 minutos. Luego las células fueron resuspendidas en 100 µl de solución de tñido (para 10 ensayos 20 µl de Anexina V maracado con fluoresceína, 20 µl de ioduro de proidio en 1000 µl de buffer Hepes provisto por el fabricante. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Transcurrido dicho tiempo, la suspensión se colocó en un portaobjetos para ser analizada en un microscopio fluorescente con una longitud de onda de excitación 450 - 500 nm y detección entre 515 y 565 nm. Se contaron alrededor de 300 células totales y con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de células en apoptosis o necrosadas respecto al total observadas.

RESULTADOS

El objetivo de nuestro trabajo aquí fue analizar la actividad apoptótica de las diferentes estructuras del LPS de *B. bronchiseptica* observadas en distintos periodos de la infección. Teniendo en cuenta que algunos factores de naturaleza proteica con actividades proapoptóticas (1, 17, 45, 76) entre ellos la toxina adenilato ciclasa hemolisina (AC-Hly) pueden copurificar con el LPS (36) como primer etapa en nuestro estudio analizamos si las preparaciones de LPS realizadas por nosotros contenían cantidades significativas de las proteínas proapoptóticas. Para ello primeramente realizamos un inmunoblot con cantidades crecientes de AC-Hly purificada (0,1 ng a 1 μ g), el cual fue revelado con anticuerpos específicos anti-AC-Hly. Así determinamos que la mínima cantidad de la toxina que puede ser detectada mediante esta técnica es de 0,1 μ g (Fig. V.3A).

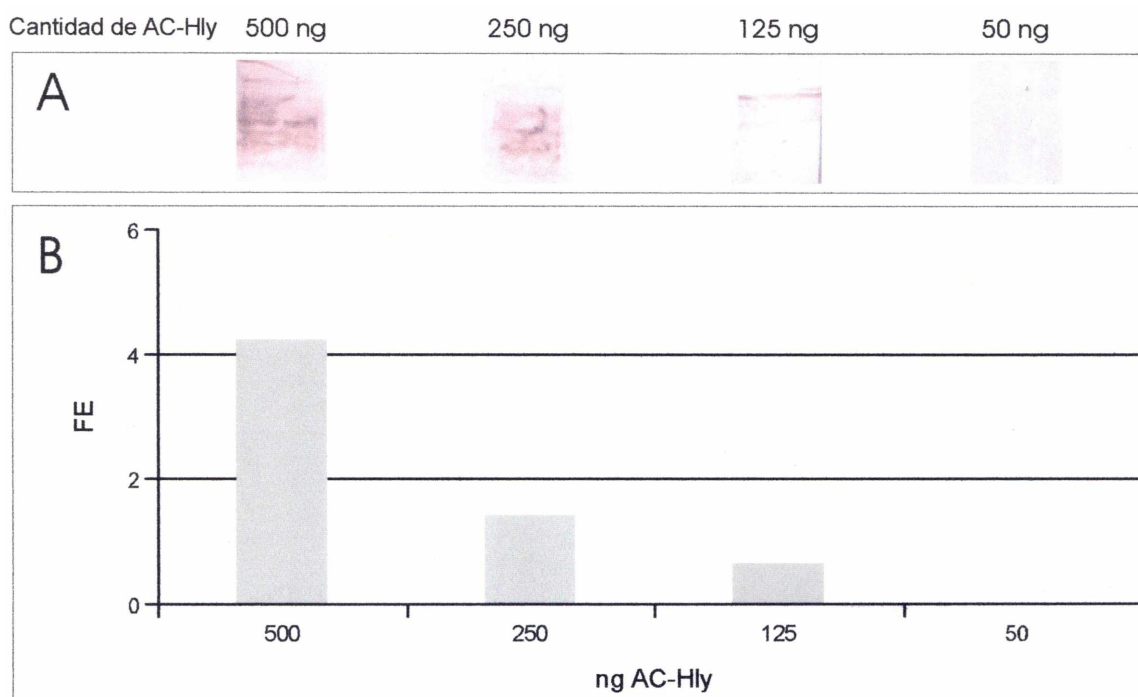


Fig. V.3. Correlación entre la mínima cantidad de AC-Hly detectable por ensayos de western blot y la mínima cantidad capaz de inducir apoptosis. El panel A muestra un western blot de AC-Hly empleando cantidades del antígeno desde 50 ng hasta 500 ng. El mismo fue revelado con un suero policlonal mono específico anti-AC-Hly. En el panel B se muestra el factor de enriquecimiento en células de epitelio pulmonar (A549) en células apoptosadas inducido por la presencia de diferentes cantidades de AC-Hly. El mismo se determinó luego de 4 horas de incubación. FE = Factor de enriquecimiento = (Abs405nm muestra - Abs405nm reactivo) / Abs405nm control de células sin agregado de AC-Hly.

A partir de este dato realizamos ensayos de apoptosis sobre las células A549 empleando diferentes cantidades de AC-Hly incluyendo la mínima detectable por western blot. Luego de 4 horas de incubación, tiempo evaluado como suficiente para detectar células en procesos

apoptóticos (45) se determinó la mínima cantidad de AC-Hly que es capaz de inducir apoptosis en una proporción apreciable de células. Así, pudimos determinar que la mínima cantidad de AC-Hly detectable por western blot no induce un aumento en la población apoptótica, obteniéndose, en este caso, resultados similares a los de los controles negativos (Fig. V.3B).

Para analizar entonces si nuestras preparaciones de LPS presentaban una cantidad suficiente de AC-Hly como para producir un efecto apoptótico que produjera falsas interpretaciones de nuestros resultados, las separamos en corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida. A partir del SDS-PAGE se realizó un inmunoblot en las mismas condiciones en que se analizaron las muestras de AC-Hly. Mediante esta técnica no fue posible detectar la presencia de AC-Hly en las preparaciones de LPS indicando que las mismas eran aptas para ser evaluadas en los ensayos de apoptosis (Fig. V.4). Con el fin DE descartar definitivamente la posibilidad de la presencia de alguna otra proteína con actividad proapoptótica, los geles conteniendo las preparaciones de LPS fueron teñidos con tinción de plata para detectar LPS y proteínas. En la figura V.4 se muestra que en estas condiciones sólo fue posible detectar las bandas correspondientes a las diferentes formas de LPS presentes en las muestras.

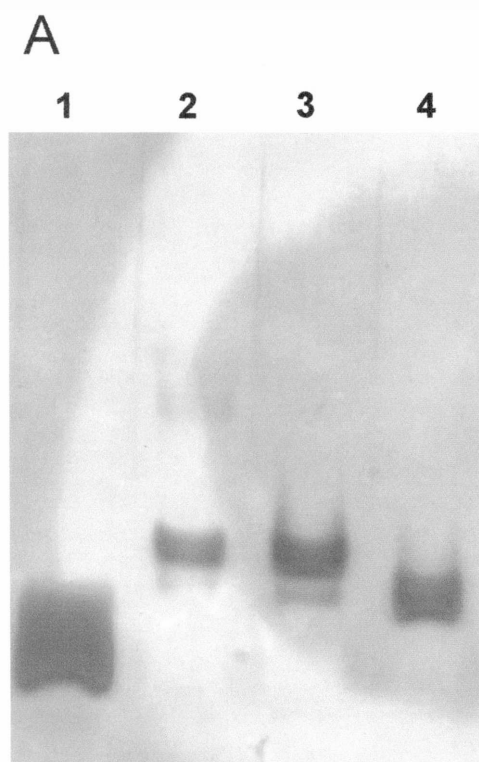
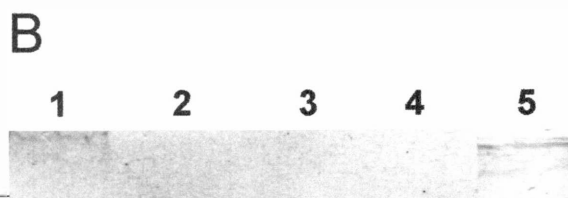


Fig. V.4. A. Perfil electroforético en geles de poliacrilamida 17,5% p/v de los LPS obtenidos de *Bb*LP39 (línea 1), *Bb*9.73 (línea 2), *Bb*R1 (línea 3) y *Bb*R4 (línea 4). **B.** Inmunoblot de las muestras corridas en A empleando como primer antígeno suero policlonal anti - AC-Hly. La línea 5 corresponde a AC-Hly purificada



Efecto apoptótico presentado por los LPS de *Bb9.73* y *BbLP39*

Habiendo analizado la calidad de nuestras preparaciones de LPS, procedimos entonces al análisis de la actividad apoptótica de los LPS purificados provenientes de la cepa parental *Bb9.73*, cuyo LPS posee una estructura completa (13) y del LPS de la cepa *BbLP39* ya caracterizada como rugosa profunda en esta Tesis. Se utilizaron diferentes tipos de células a fin de determinar si existía algún tipo de actividad selectiva. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

a) Células derivadas de epitelio pulmonar humano (A549). Se utilizó la línea celular A549 ya que se trata de células derivadas de epitelio pulmonar. Este tipo de células se encuentra en un íntimo contacto a lo largo de la infección con *B. bronchiseptica* y la relación de la bacteria con este tipo de células podría ser importante en el desarrollo y persistencia de la infección dentro del hospedador.

Luego de ser incubadas las células junto a las preparaciones de LPS, pudimos observar que ambos tipos de LPS, el completo de la cepa parental y el rugoso profundo del mutante *BbLP39*, presentaban actividad apoptótica en todas las concentraciones ensayadas (0,2 a 200 ng KDO) sin poderse observar en forma significativa diferencia entre ellos (Fig. V.5). Dado que no se observaban diferencias en la inducción de apoptosis, se analizó en forma paralela si las preparaciones de LPS en las cantidades utilizadas desencadenaban procesos necróticos en las células. Con tal fin siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante de los Kit de apoptosis empleamos evaluamos la presencia de fragmentos de ADN en los sobrenadantes de los cultivos celulares antes de realizar la lisis celular. En ninguna de las cantidades utilizadas de ambos tipos de LPS se pudo observar un aumento significativo de células necrosadas respecto a los controles.

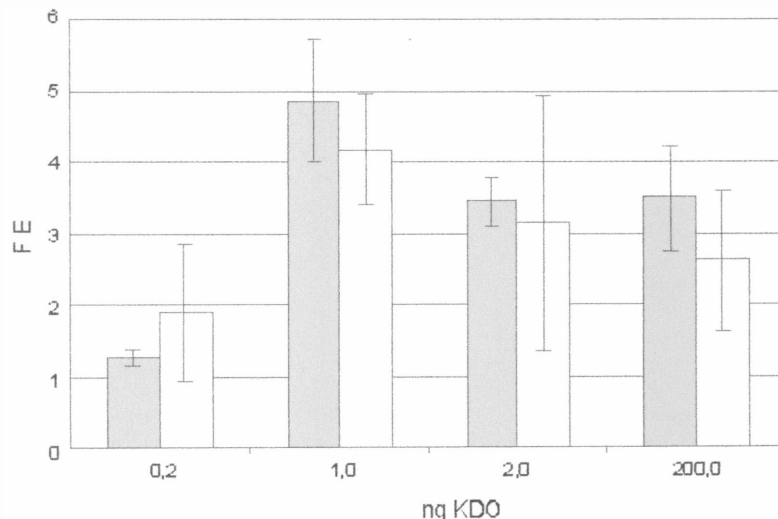


Fig. V.5. Apoptosis de células epiteliales A549 empleando como molécula inductora al LPS en distintas cantidades. En gris se grafican los resultados obtenidos con el LPS con estructura completa y en blanco los correspondientes a la estructura trunca. Con FE se designa al factor de enriquecimiento ($FE = (Abs_{405nm} \text{ muestra} - Abs_{405nm} \text{ reactivo}) / Abs_{405nm}$)

control de células sin agregado de LPS). Los datos se corresponden a cuatro experimentos independientes entre sí.

b) Monocitos. Estas células provenientes de la serie blanca se encuentran presentes en el pulmón y forman parte de las primeras defensas desarrolladas por el hospedador contra la infección. En forma paralela a los ensayos realizados sobre las células derivadas de epitelio pulmonar, se realizaron ensayos sobre células monocíticas de diferente origen. Para ello utilizamos tanto una línea celular derivada de monocitos, la línea U937, como así también monocitos provenientes de donadores voluntarios sanos.

La actividad apoptótica de las preparaciones de LPS fueron evaluadas de igual manera que en el caso de las células epiteliales. Los resultados obtenidos con ambos tipos de células fueron similares entre sí pero difieren sustancialmente de los presentados para las células epiteliales. Aquí se observa una diferencia significativa (Fig. V.6) entre las actividades apoptóticas desarrolladas por ambos tipos de LPS. Mientras el LPS completo induce una duplicación de la población apoptótica, el LPS truncado no presenta valores significativamente diferentes al observado en los controles negativos sin agregado de LPS ($FE_{BbLP39} = 0.3 \pm 0.2$; $FE_{ctrl} = 0.2 \pm 0.2$). Los resultados obtenidos fueron similares para ambas muestras de células eucariotas. Al igual que en el caso anterior no se detectó necrosis en ninguno de estos ensayos.

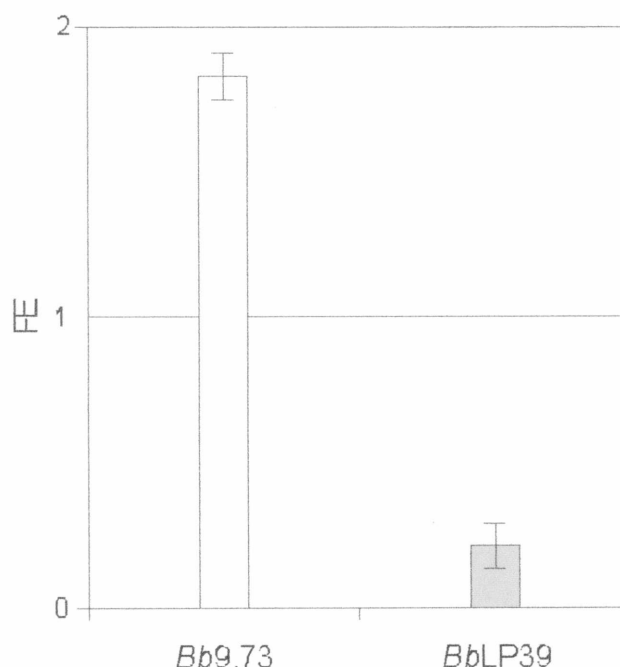
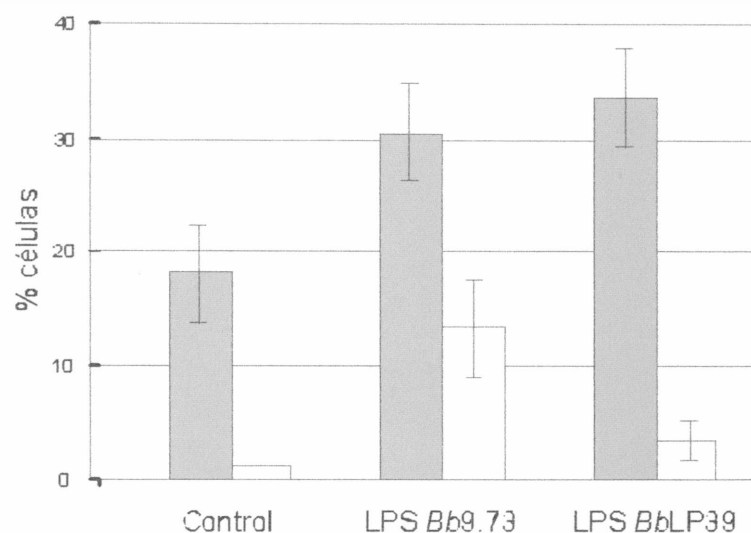


Fig. V.6. Apoptosis de células U937 empleando como efector al LPS completo (blanco) o al truncado (gris). En ambos casos se empleó LPS conteniendo 1 μ g de KDO. Con FE se designa al factor de enriquecimiento ($FE = (Abs_{405nm} \text{ muestra} - Abs_{405nm} \text{ reactivo}) / Abs_{405nm} \text{ control de células sin agregado de LPS}$). Los datos se corresponden a tres experimentos independientes entre sí.

c) Neutrófilos de donadores sanos voluntarios. En esta oportunidad la actividad apoptótica y necrótica fue determinada con el kit comercial Annexin-V-Fluos Staining Kit de

Roche siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Transcurridas 4 horas de incubación ambas formas de LPS presentaron actividad apoptótica. Los valores del porcentaje de la población en apoptosis respecto al número total de células presentes indican una leve diferencia a favor del LPS trunco ($33.6 \pm 8\%$ *BbLP39*; $30.3 \pm 10\%$ *Bb9.73*) (Fig. V.7). Se pudo observar además una diferencia significativa se presentaba al analizar la proporción de células necrosadas, siendo el número mayor en el caso del LPS completo ($13,5 \pm 5\%$ células necrosadas en presencia del LPS de *Bb9.73* y $3,5 \pm 2\%$ en presencia del LPS de



BbLP39).

Fig. V.7. Apoptosis (gris) y necrosis (blanco) de neutrófilos empleando como efector al LPS completo (obtenido de *Bb9.73*) y al LPS trunco (obtenido de *BbLP39*). En ambos casos se empleó una cantidad de LPS correspondiente a $1 \mu\text{g}$ de KDO. Las determinaciones del porcentaje de células apoptóticas y necrosadas se empleó el Kit Annexin-V-Fluos Staining Kit de Roche™.

Efecto apoptótico presentado por los LPS de los aislamientos *BbR1* y *BbR4*

En forma paralela analizamos la actividad apoptótica de los LPS obtenidos de los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos durante diferentes estadios de la infección. A continuación se presentan los resultados obtenidos con los diferentes tipos celulares.

a) Células derivadas de epitelio pulmonar humano (A549). Las incubaciones de estas células con las preparaciones de LPS se realizaron de igual forma que la descrita anteriormente. Luego de incubaciones de 4 hs a 37°C $5\% \text{CO}_2$ pudimos observar que ambas preparaciones de LPS, completo y trunco, se comportan de manera similar. Como se observa en la figura V.8, ambas estructuras inducen apoptosis y el porcentaje de células apoptóticas que se induce depende de la cantidad de LPS empleado en el ensayo. El valor máximo de células apoptóticas (Aprox. $\text{FE}=3$ para ambos tipos de LPS) se alcanzó cuando se empleó una cantidad de LPS correspondiente a $2 \mu\text{g}$ de KDO o mayores. En ninguna de las condiciones analizadas observamos células necrosadas.

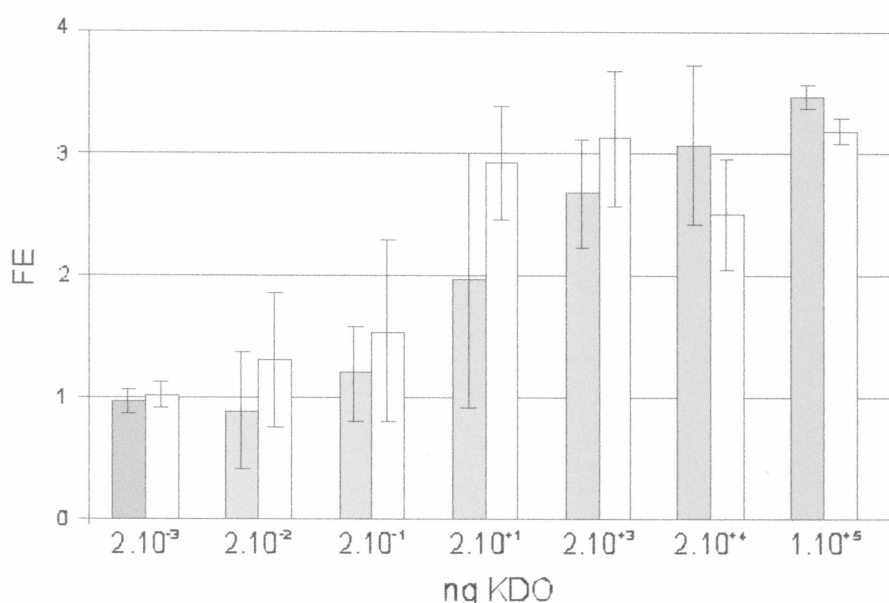


Fig. V.8. Apoptosis de células epiteliales A549 empleando como molécula inductora al LPS proveniente de aislamientos humanos en distintas cantidades. En gris se grafican los resultados obtenidos con el LPS con estructura completa (*BbR1*) y en blanco los correspondientes a la estructura trunca (*BbR4*). Con FE se designa al factor de enriquecimiento ($FE = (Abs_{405nm} \text{ muestra} - Abs_{405nm} \text{ reactivo}) / Abs_{405nm} \text{ control de células sin agregado de LPS}$). Los datos se corresponden a cuatro experimentos independientes entre sí.

b) Monocitos y neutrófilos de donadores voluntarios sanos. La actividad apoptótica de los LPS fue ensayada en forma separada sobre monocitos y neutrófilos provenientes de donadores sanos. Estas células se encontrarían en contacto con *B. bronchiseptica* durante todo el proceso infeccioso, inclusive durante el periodo crónico. El comportamiento presentado por el LPS purificado a partir de *BbR4* es dependiente del tipo celular y presenta diferencias significativas respecto al comportamiento del LPS de *BbR1* tal como se indica en la figura V.9 y se detalla a continuación.

Los monocitos se lisan en forma inmediata en presencia del LPS de *BbR1* en las cantidades utilizadas ($0,05 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) indicando que esta estructura de LPS induce una necrosis sobre este tipo celular que no fue posible de observar con el LPS de *BbR4*. El LPS proveniente de *BbR4* no induce ni procesos necróticos ni apoptóticos en este tipo de células.

En relación a los ensayos realizados sobre neutrófilos pudimos observar que ambos LPS no inducen necrosis pero sí apoptosis. La actividad apoptótica fue similar para ambos LPS ($27,2 \pm 5\%$ células apoptóticas en presencia del LPS de *BbR1* y $26,1 \pm 5\%$ en presencia del LPS de *BbR4*) y levemente inferior a la de los LPS *Bb9.73* ($30,4 \pm 5\%$) y *BbLP39* ($33,6 \pm 5\%$) (Fig. V.7 y V.9).

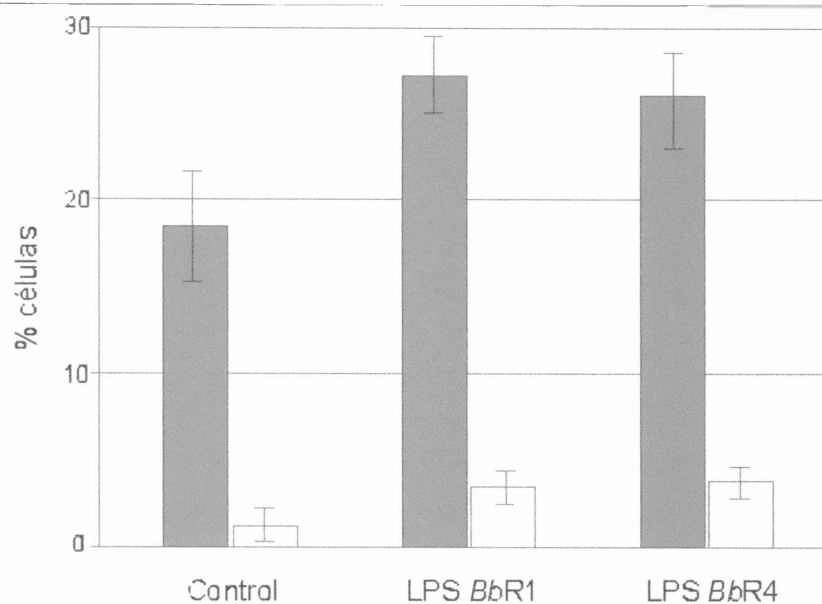


Fig. V.7. Apoptosis (gris) y necrosis (blanco) de neutrófilos empleando como efector al LPS completo (obtenido de *BbR1*) y al LPS trunco (obtenido de *BbR4*). En ambos casos se empleó una cantidad de LPS correspondiente 1 μ g de KDO. Las determinaciones del porcentaje de células apoptóticas y necrosadas se empleó el Kit Annexin-V-Fluos Staing Kit de RocheTM.

DISCUSIÓN

Los patógenos bacterianos desarrollan diferentes mecanismos a través de los cuales son capaces de evadir y/o alterar la acción del sistema inmune del hospedador. Los hallazgos recientes han permitido la identificación de numerosos factores bacterianos involucrados en una variedad de estrategias de evasión reforzando la visión acerca de la complejidad de la interacción bacteria-hospedador.

Dentro de los mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune se ha incrementado notablemente el conocimiento de la inducción o prevención de la muerte celular programada o apoptosis por parte de los patógenos. La inducción de la muerte celular por parte de las bacterias permitiría eliminar células claves dentro del sistema inmune. Sin embargo es posible suponer que para ciertos patógenos intracelulares la inducción de la apoptosis resultaría desfavorable. Esto es consecuente con la observación de que bacterias intracelulares son capaces de inhibir la muerte celular de la célula que los aloja (22).

Esa doble posibilidad de inhibir o de activar la apoptosis en ocasiones se da para un mismo microorganismo sobre distintos tipos celulares (3, 6, 43, 48, 65, 72). Esto muestra al fenómeno de apoptosis como un mecanismo regulable por el patógeno para desarrollar y mantener la infección.

En las infecciones causadas por *B. bronchiseptica* se ha podido observar células en procesos de apoptosis y más aún se ha sugerido que la inducción de apoptosis en determinadas células es un paso fundamental en el desarrollo de las primeras etapas de la infección (28, 31). Se desconoce aún si este proceso tiene algún rol durante la etapa crónica de la infección de *Bordetella*. En principio parecería que durante esta etapa la inhibición de la apoptosis es la que juega un rol ya que durante la misma se ha descrito que los factores inductores de la apoptosis en células eucariotas (AC-Hly, FHA y PRN) dejan de ser expresados (27). Preservando la integridad celular a través de la inhibición de la apoptosis el patógeno estaría resguardando su nicho intracelular. Como hemos descrito anteriormente la estructura del LPS de *B. bronchiseptica* también sufre un cambio pero aún su función no ha sido esclarecida. Podría suponerse que *B. bronchiseptica* induce la muerte celular programada a través de AC-Hly, FHA, PRN y un LPS liso durante las primeras etapas de la infección pero luego una vez alcanzado el período crónico esta actividad resultaría perjudicial para la bacteria, por lo que los factores proteicos dejan de ser sintetizados y se presenta un LPS rugoso profundo con actividad apoptótica diferente. Esta posibilidad de que diferencias estructurales en el LPS de *B. bronchiseptica* presente distintas actividades proapoptóticas no ha sido descrita hasta el momento. Para avanzar en este conocimiento en el presente capítulo realizamos ensayos de apoptosis *in vitro* empleando diferentes tipos de células: células derivadas de epitelio pulmonar o pertenecientes a la serie blanca. Ambos tipos celulares se relacionan con *B. bronchiseptica* durante el proceso infeccioso pudiendo estar involucrados en diferentes etapas del desarrollo de la infección. Los diferentes LPS

incluyeron a los derivados de las cepas *Bb*9.73 (LPS completo) y la *Bb*LP39 (LPS rugoso) y a aquellos provenientes de aislamientos humanos obtenidos, tanto de la etapa aguda (*Bb*R1, LPS completo) como del correspondiente al período crónico (*Bb*R4, LPS rugoso profundo). Los resultados obtenidos muestran diferencias importantes en cuanto a la inducción de muerte celular de manera dependiente del tipo de célula utilizado y del LPS empleado como inductor.

En los ensayos realizados con células derivadas de epitelio pulmonar humano (A549), las células presentan la misma sensibilidad ante el estímulo apoptótico del LPS tanto en su forma completa como en su forma rugosa profunda provenientes de las cepas *Bb* 9.73 y *Bb*LP39 respectivamente. Es decir que ambas formas de LPS inducen en igual magnitud un aumento en la proporción de células epiteliales apoptóticas. Se observa para ambas formas un aumento de hasta 4 veces en la proporción de células en proceso apoptótico respecto al control sin tratamiento, indicando que la actividad apoptótica sobre las células A549 estaría asociada al lípido A o en la zona más cercana al lípido A o en ambas. Resultados similares se observaron con los LPS provenientes de los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos de pacientes con infección aguda y crónica. La única diferencia observada es que el efecto de inducción para estos LPS obtenidos de bacterias provenientes de infecciones humanas resultó dependiente de la dosis empleada. En el caso del aislamiento de origen humano el nivel máximo ($FE = 3 \pm 0.8$) fue alcanzado con el equivalente a 20 ng de KDO, mientras que el LPS de *Bb*9.73 produjo este aumento con una cantidad 20 veces menor (1 ng de KDO). Este efecto puede deberse a que los LPS derivados de *Bb*9.73 posean una actividad apoptótica intrínseca mayor, por lo que niveles máximos del Factor de Enriquecimiento (FE) se obtengan a concentraciones menores del LPS. Esta diferencia puede ser atribuida a diferencias estructurales que aún no han sido determinadas y que requieren de futuros estudios.

Los resultados obtenidos sobre las células derivadas de la línea blanca, presentan diferentes respuestas según el tipo de célula y el tipo de LPS utilizado. En neutrófilos, todos los LPS utilizados en su forma completa o trunca son capaces de inducir un aumento de hasta un 35% en la proporción de células apoptóticas. De todos los LPS ensayados sólo el de la cepa *Bb*9.73 induce una pequeña pero significativa proporción de neutrófilos necróticos ($13,5 \pm 5\%$). Frente a los monocitos o células derivadas de éstos (U937), la única forma de LPS que indujo actividad apoptótica fue la correspondiente a *Bb*9.73, llegando casi a duplicar la población apoptosada. La única forma que indujo necrosis en estas células fue la proveniente del aislamiento obtenido de la fase aguda de la infección (*Bb*R1) que en las concentraciones utilizadas fue instantánea.

Las diferencias observadas en las actividades apoptóticas y necrosantes de los LPS completos de *Bb*9.73 y *Bb*R1 pueden deberse a las diferencias estructurales entre ambas moléculas. Esto indica que existiría una especificidad en el tipo de célula blanco dependiente de la estructura del LPS. A través de esta diferencia de actividades *B. bronchiseptica* podría

emplear esta estrategia de evasión de manera de poder infectar a distintos hospedadores susceptibles. Así, los aislamientos que provienen de un mismo hospedador deberían poseer similitudes estructurales en el LPS. Algunos trabajos publicados siguen esta tendencia pero existen excepciones que indicarian otros roles para el LPS que aún deben ser analizados en profundidad (78). Los datos presentados mostrando diferencias entre los neutrófilos y monocitos sugiere roles diferentes para ambos tipos celulares durante el desarrollo de la infección.

A partir de los resultados obtenidos hemos confeccionado un primer modelo acerca de uno de los posibles roles de la variación estructural del LPS a lo largo de la infección. En particular hemos demostrado que el LPS es capaz de modular la actividad apoptótica de diferentes células del hospedador dependiendo de su estructura. Esto es, *B. bronchiseptica* gracias a la presencia de diferentes factores de virulencia, incluyendo un LPS completo, inicia las primeras etapas de la infección e induce la apoptosis de células blancas. Luego para persistir la bacteria reduciría de manera significativa la expresión de los factores proteicos, altamente antigénicos que podrían desencadenar un proceso apoptótico (FHA, PRN y AC-Hly). Nuestros resultados muestran que los LPS trancos o *deep rough* no son capaces de inducir la muerte de monocitos o células derivadas de éstos. Así, el LPS rugoso profundo característico de la fase crónica de la enfermedad jugaría un rol esencial en la vida intracelular.

El equilibrio entre los mecanismos de patogenicidad de la bacteria y aquellos involucrados en erradicar al patógeno se ha mantenido a lo largo de todo el proceso evolutivo de ambos organismos. El establecimiento de este equilibrio ha generado las condiciones adecuadas para que ambos protagonistas se adapten a la presencia del otro a lo largo del tiempo. Esto ha permitido el desarrollo de enfermedades persistentes, en las que el patógeno no ocasiona daños importantes al hospedador. La complejidad de esta interacción ha impedido determinar la totalidad de los componentes involucrados en ella y el rol de los mismos. En relación a los mecanismos que integran la red de interacciones sólo han sido descriptos parcialmente y en la mayor parte de los casos desde el punto de vista del patógeno. La inducción de la apoptosis se enmarcaría dentro de uno de estos diferentes mecanismos desarrollados por el patógeno. En la interacción patogénica de *B. bronchiseptica* existen varios componentes bacterianos que podrían estar involucrados en la inducción de la apoptosis celular, entre ellos el LPS. Hemos dado aquí un primer paso hacia la comprensión del rol de este componente en la inducción de la apoptosis de las células del hospedador. Futuros ensayos que involucren el análisis tanto de los receptores y factores involucrados, así como posibles interacciones cooperativas entre los diferentes componentes de la superficie bacteriana con el LPS permitirán seguir avanzando en la comprensión de la importancia que posee el procesos de inducción de apoptosis en el desarrollo de la enfermedad como en la persistencia dentro del hospedador.

Referencias

1. Abramson T., Kedem H., Relman D.A. 2001. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 69:2650-2658.
2. Akira S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 15:5-11. Erratum in: *Curr Opin Immunol.* 15:238.
3. Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R., Suggett S., Devaux B., Radolf J.D., Klimpel C.R., Codowski P., Zychlinsky A. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 285:736-9.
4. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171.
5. Bachelet M., Chouaid C., Havet N., Mashan J., Barre A., Housset B., Vargatag B.B. 1992. Modulation of arachidonic acid metabolism and cyclic AMP content of human alveolar macrophages. *Eicosanoids.* 5:185-90.
6. Balcewicz-Sablinska M.K., Keane J., Kornfeld H., Remold H.G. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNFR2, resulting in inactivation of TNF- α . *J. Immunol.* 161:2636-41.
7. Baldwin A.S. Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14:649-83.
8. Beutler B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 12:20-6.
9. Boise L.H., Collins C.M. 2001. *Salmonella*-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?. *Trends Microbiol.* 9:64-67.
10. Chang H.Y., Yang X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:821-46.
11. Clifton D.R., Goss R.A., Sahni S.K., van Antwerp D., Baggs R.B., Marder V.J., Silverman D.J., Sporn L.A. 1998. NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4646-51.
12. Dellacasagrande J., Capo C., Raoult D., Mege J.L. 1999. IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol.* 162:2259-65.
13. Di Fabio J.L., Caroff M., Karibian D., Richards J.C., Perry M.B. 1992. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 76:275-281.
14. Fadok V.A., de Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M., Bratton D.L. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* 276:1071-7.
15. Fan T., Lu H., Hu H., Shi L., McClarty G.A., Nance D.M., Greenberg A.H., Zhong G. 1998. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 187:487-96.
16. Foo SY, Nolan GP. 1999. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet.* 15:229-35.
17. Forde C.B., Shi X., Li J., Roberts M. 1999. *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on *bvg*-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun.* 67:5972-5978.
18. Fratazzi C., Arbeit R.D., Carini C., Remold H.G. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol.* 158:4320-7.
19. Gagliardini V., Fernandez P.A., Lee R.K., Drexler H.C., Rotello R.J., Fishman M.C., Yuan J. 1994. Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science.* 263:826-8. Erratum in: *Science* 264:1388.
20. Gao, L-Y., Abu Kwaik, Y. 1999. Activation of caspase-3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun.* 67:4886-4894.
21. Gao, L-Y., Abu Kwaik, Y. 1999. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun.* 67:862-870.
22. Gao L.Y., Kwaik Y.A. 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8:306-313.
23. Gottlieb R.A. 2000. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* 482:6-12.
24. Green D.R., Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-12.
25. Gross A., Terraza A., Ouahrani-Bettache S., Liautard J., Dornand J. 2000. *In vitro Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun.* 68:342-351.
26. Gruss H.J., Dower S.K. 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 85:3378-404.

27. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol.* 33:2002-2006.
28. Gueirard P., Druilhe A., Pretolani M., Guiso N. 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun.* 66:1718-1725.
29. Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 162:331-337.
30. Guzman C.A., Domann E., Rohde M., Bruder D., Darji A., Weiss S., Wehland J., Chakraborty T., Timmis K.N. 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 20:119-26.
31. Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 1999. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun.* 67:6109-6118.
32. Hersh D., Weiss J., Zychlinsky A. 1998. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol.* 1:43-8.
33. Hersh D., Monack D.M., Smith M.R., Ghori N., Falkow S., Zychlinsky A. 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2396-401.
34. Herzenberg L.A., Weir D.M., Blacwell C. 1996. Weir's Handbook of experimental immunology. Blackwell Science, Inc., Cambridge Mass.
35. Hilbi H., Chen Y., Thirumalai K., Zychlinsky A. 1998. The Interleukin 1 β -converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:32895-32900.
36. Hozbor D., Rodriguez M.E., Fernandez J., Lagares A., Guiso N., Yanterne O. 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol.* 38:273-278.
37. Isogai E., Isogai H., Kimura K., Fujii N., Takagi S., Hirose K., Hayashi M. 1996. *In vivo* induction of apoptosis and immune responses in mice by administration of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 64:1461-1466.
38. Janeway C. A. Jr. y Travers P. 1996. Immunobiology. The Immune system in health and disease. Segunda Edición. Current Biology Limited San Francisco y Fladelfia y Garland Publishing Inc Nueva York y Londres Capítulo 9. Host defense against infection
39. Janssens S., Beyaert R. 2003. Role of Toll like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 16:637-46.
40. Kaisho T., Akira S. 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 22:78-83.
41. Karin M., Lin A. 2002. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunol.* 3:221-227.
42. Karkhanis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J., Carlo D.J. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem.* 85:595-601.
43. Keane J., Balcewicz-Sablinska M.K., Remold H.C., Chupp G.L., Meek B.B., Fenton M.J., Kornfeld H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 65:298-304.
44. Khelef N., Zychlinsky A., Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4064-4071.
45. Khelef N., Guiso N. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 134:27-32.
46. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-88.
47. Klingler K., Tchou-Wong K.M., Brandli O., Aston C., Kim R., Chi C., Rom W.N. 1997. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 65:5272-8.
48. Kornfeld H., Mancino G., Colizzi V. 1999. The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ.* 6:71-8.
49. Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.G. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 371:346-7.
50. LeGrand E.K. 2000. Implications of early apoptosis of infected cells as an important host defense. *Med Hypotheses.* 54:591-6.
51. Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 185:1481-6.
52. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1:135-45.
53. Merrick J.C., Edelson B.T., Bhardwaj V., Swanson P.E., Unanue E.R. 1997. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am J Pathol.* 151:785-92.

54. Mills S.D., Boland A., Sory M.P., van der Sluisen B., Kerhne C., Finlay B.B., Camalis G.B. 1997. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94:12638–43.
55. Monack D.M., Meccas J., Ghori N., Falkow S. 1997. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 94:10385–90.
56. Muller A., Hacker J., Brand B.C. 1998. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun.* 64:4900–6.
57. Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'Amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A. 2000. Differential expression and regulation of toll like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 164:5998–6004.
58. Njamkepo E., Pinot F., Francois D., Guiso N., Polla B.S., Bachelet M. 2000. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol.* 183:91–9.
59. Ojcius D.M., Souque P., Perfettini J.L., Dautry-Varsat A. 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J Immunol.* 161:4220–26.
60. Orth K., Palmer L.E., Bao Z.Q., Stewart S., Rudolph A.E., Bliska J.B., Dixon J.E. 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285:1920–23.
61. Paul W.E. 1998. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.; Thomsom A. 1998. *The Cytokine Handbok*. Academic Press, Ltd. London, UK.
62. Richter-Dahlfors A., Buchan A.M., Finlay B.B. 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.* 186:569–80.
63. Rogers H.W., Callery M.P., Deck B., Unanue E.R. 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* 156:679–84.
64. Rojas M., Barrera L.F., Puzo G., Garcia L.F. 1997. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *J. Immunol.* 159:1352–61.
65. Rojas M., Olivier M., Gros P., Barrera L.F., Garcia L.F. 1999. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol.* 162:6122–31.
66. Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Lafont V., Mangeat P., Heesemann J., Rouot B. 1997. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun.* 65:4813–21.
67. Schnaitman C.A. and Klena J.D. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Reviews.* 57:655–682.
68. Shibayama K., Doi Y., Shibata N., Yagi T., Nada T., Iinuma Y., Arakawa Y. 2001. Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions. *Infect Immun.* 69:3181–9.
69. Song Z., Steller H. 1999. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *TIBS.* 24:M49–M52.
70. Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 267:1445–9.
71. Stroh C., Schulze-Osthoff K. 1998. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 5:997–1000.
72. Underhill D.M., Ozinsky A., Smith K.D., Aderem A. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96:14459–63.
73. Valverde C., Hozbor D.F., Lagares A. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques.* 22:230–2.
74. Wyllie A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284:555–6.
75. Yuk M.H., Harvill E.T., Miller J.F. 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 28:945–959.
76. Yuk M.H., Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 35:991–1004.
77. Zychlinsky A., Prevost M.C., Sansonetti P.J. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 358:167–9.
78. van den Akker W. 1998. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiol.* 144:1527–1535.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La interacción entre un patógeno y su hospedador es un proceso dinámico y complejo en el que entran en juego, por parte del patógeno, numerosos factores y mecanismos de virulencia, y por parte del hospedador, diversos mecanismos de defensa. La superación de las actividades de uno sobre las del otro hace que se desencadene o se aborte el ciclo infeccioso. Así, para lograr una infección efectiva, el patógeno en cada una de las etapas del proceso debe evadir las defensas que el hospedador desarrolla. Una vez superadas todas las etapas, el patógeno puede persistir en el hospedador o diseminarse hacia otro hospedador susceptible en donde reinicia el ciclo infeccioso. En los casos de persistencia, la infección evoluciona de manera asintomática convirtiendo al hospedador en un portador del patógeno que lo disemina entre la población susceptible. Estos casos silenciosos, si no existe sospecha de infección, no son diagnosticados y consecuentemente representan un problema serio en el área de salud. Los estudios moleculares sobre la etapa de persistencia o cronicidad de la enfermedad son los que podrán contribuir al desarrollo de estrategias que realmente tiendan a erradicarla en forma definitiva.

Los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de desarrollar procesos crónicos de infección son diversos y no del todo conocidos, sin embargo todos ellos se caracterizan porque la bacteria escapa a la respuesta inmune desarrollada durante la etapa aguda de infección. Esta evasión puede lograrse porque el patógeno modifica la respuesta inmunológica del hospedador o varía la expresión y/o la estructura de sus antígenos, o ambas. El cambio de los epitopes expuestos a la acción inmune del hospedador se denomina variación antigénica. Esta variación puede ocurrir a través de mutaciones, recombinaciones a nivel génico (14) o a través de sistemas de transducción de señales que median la alternancia entre dos estados fenotípicos diferentes. La variación de los antígenos en general se observa en la superficie de la bacteria ya que es la que está más expuesta a la acción del sistema inmune del hospedador. Dentro de estos antígenos se encuentra el lipopolisacárido (LPS) cuya variación estructural ya ha sido descrita para *Haemophilus influenzae* (15), para *Helicobacter pylori* (1, 2, 22), para *Neisseria meningitidis* (6), e incluso para el patógeno *Bordetella bronchiseptica* (7) que es el patógeno objeto de nuestros estudios. En el caso de *B. bronchiseptica* aún no se ha determinado el mecanismo por el cual se produce la variación del LPS desde una forma completa en el inicio de la infección hacia una forma trunca en la fase crónica. Esto se debe probablemente a que sólo recientemente se ha podido determinar parte de la genética y bioquímica de ésta molécula. Más aún, el papel que cumple el LPS en el proceso patogénico no se ha esclarecido completamente. Tanto el estudio del rol del LPS como el de su variación estructural a lo largo de la infección de *B. bronchiseptica*, son los aspectos del conocimiento sobre los que hemos focalizado mi trabajo de Tesis.

En primer lugar se analizó la relación entre el sistema de traducción de señales BvgAS (y más específicamente la de los agentes moduladores que modifican la actividad de BvgAS) y la variación estructural del LPS. La idea de emprender este análisis surgió luego de observar la cinética del cambio de expresión de los factores proteicos que ocurre

durante la infección causada por *B. bronchiseptica* (7, 9). Esta cinética parecía coincidir con la correspondiente al fenómeno de *modulación de fases* mediado por el sistema de traducción de señales BvgAS. Sin embargo, la falta de un conocimiento acabado sobre la relación entre uno de los componentes de superficie, el LPS, que varía *in vivo*, y el sistema BvgAS dificultaba el reconocimiento de un posible paralelismo entre el fenómeno observado *in vivo* y la modulación fenotípica. Es por ello que nos propusimos encarar la búsqueda de dicha relación. Los resultados alcanzados indican que la estructura del LPS puede ser regulada, al menos, a través de dos mecanismos: uno mediado por moduladores del sistema BvgAS y otro que obedece a los cambios de temperatura del ambiente pero que es independiente de BvgAS tal como lo indicó la respuesta obtenida con un mutante BvgA⁻ (Fig. II.9). El primer mecanismo estaría involucrado en la regulación de la estructura de la parte distal del LPS, principalmente del antígeno O. En cambio, las estructuras más cercanas al lípido A, incluyendo al core estarían reguladas por la temperatura. La acción de sistemas de regulación distintos podría proveer estrategias más precisas para la adaptación del patógeno no sólo a diferentes nichos ecológicos en los que esta bacteria es capaz de desarrollarse sino también a diferentes hospedadores. Así, durante el transcurso de las infecciones en los mamíferos que habitualmente infecta *B. bronchiseptica*, el LPS debe presentar una estructura completa, conteniendo antígeno O. La inclusión del hombre dentro del rango de hospedadores de *B. bronchiseptica* requiere quizás de modificaciones en el LPS consistentes en una disminución en la producción de esta parte distal del LPS asemejándose aún más a *B. pertussis*, que es patógeno obligado del hombre. Resulta interesante en particular la modificación observada por acción de la temperatura en el LPS de los aislamientos humanos. La bacteria proveniente de un período agudo de la infección (BbR1) no presenta durante el crecimiento a 37° C una síntesis importante de antígeno O. Dado que *B. pertussis* tampoco presenta antígeno O se ha sugerido que su presencia en *B. bronchiseptica* resulta perjudicial para la infección de humanos (5, 18, 19). Sin embargo, el crecimiento a bajas temperaturas de BbR1 parece inducir una estructura que podría ser un antígeno O discreto. Esto indica que los genes para sintetizar porciones distales en el LPS de BbR1 se encuentran presentes y que se encontrarían inactivados durante la infección en humanos. Si la bacteria se encuentra en un medio diferente en donde las temperaturas promedio son inferiores entonces estos genes serían activados. Mientras que la presencia de esta estructura podría resultar perjudicial o al menos innecesaria para el proceso infeccioso en humanos, sería importante su presencia durante la vida libre o durante la transmisión de hospedador en hospedador o directamente para otros hospedadores. Esto último ha sido descripto por otros autores, en donde la ausencia de antígeno O resulta perjudicial para la colonización definitiva de los pulmones de ratones (5). Esto pone en evidencia las diferencias sutiles pero en ocasiones relevantes existentes entre los sistemas inmunológicos de los modelos animales utilizados y el humano.

Un aspecto a destacar es que ninguno de los moduladores del sistema BvgAS fue capaz de inducir un cambio en la estructura del LPS hacia una forma rugosa profunda

característica del período crónico de la infección. Sin embargo, no puede descartarse que exista algún otro modulador que actúe *in vivo* induciendo dichos cambios.

La variación estructural del LPS, junto a la disminución en la expresión de factores proteicos, en particular con la toxina RTX de *B. bronchiseptica*, la AC-Hly, sugiere además una posible interrelación entre estos componentes. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo no muestran una relación clara entre el LPS y la toxina AC-Hly, a diferencia de lo observado en otros microorganismos en donde se ha establecido una interrelación entre la biosíntesis del LPS y de toxinas pertenecientes a la familia RTX (4, 21). Aún así, no descartamos la posibilidad de la existencia de una interacción entre ambos componentes a través de mecanismos que no hemos evaluado, como ser la regulación de síntesis a nivel transcripcional o postraducciona. Más aún, Hozbor y colaboradores (1999) (11) han descrito una relación estructural entre el LPS y AC-Hly que podría ser importante para la actividad tóxica de una o ambas toxinas.

En la etapa siguiente de nuestro trabajo, pero siempre focalizados en el esclarecimiento del conocimiento del rol del LPS y su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia de *B. bronchiseptica* en el hospedador construimos y caracterizamos un mutante de *B. bronchiseptica* que presenta un LPS alterado, fenotipo *deep rough* (al que hemos designado BbLP39) con estructura similar a la observada en los aislamientos provenientes de los estadios crónicos de la enfermedad. Los resultados que hemos obtenido muestran que la mutación responsable del fenotipo *deep rough* (mutagénesis insercional sitio específica sobre el gen *waaC*), no es letal y más aún el mutante sigue produciendo niveles detectables de los principales factores de virulencia. A través de los ensayos *in vivo* pudimos determinar que la forma trunca del LPS (LPS *deep rough*) imposibilita una colonización efectiva en el hospedador. A través de ensayos *in vitro* empleando células de epitelio pulmonar A549 pudimos observar que BbLP39 tiene reducida su capacidad de adhesión a las células eucarióticas. Este resultado explicaría la dificultad del mutante para iniciar la infección en los ensayos *in vivo*.

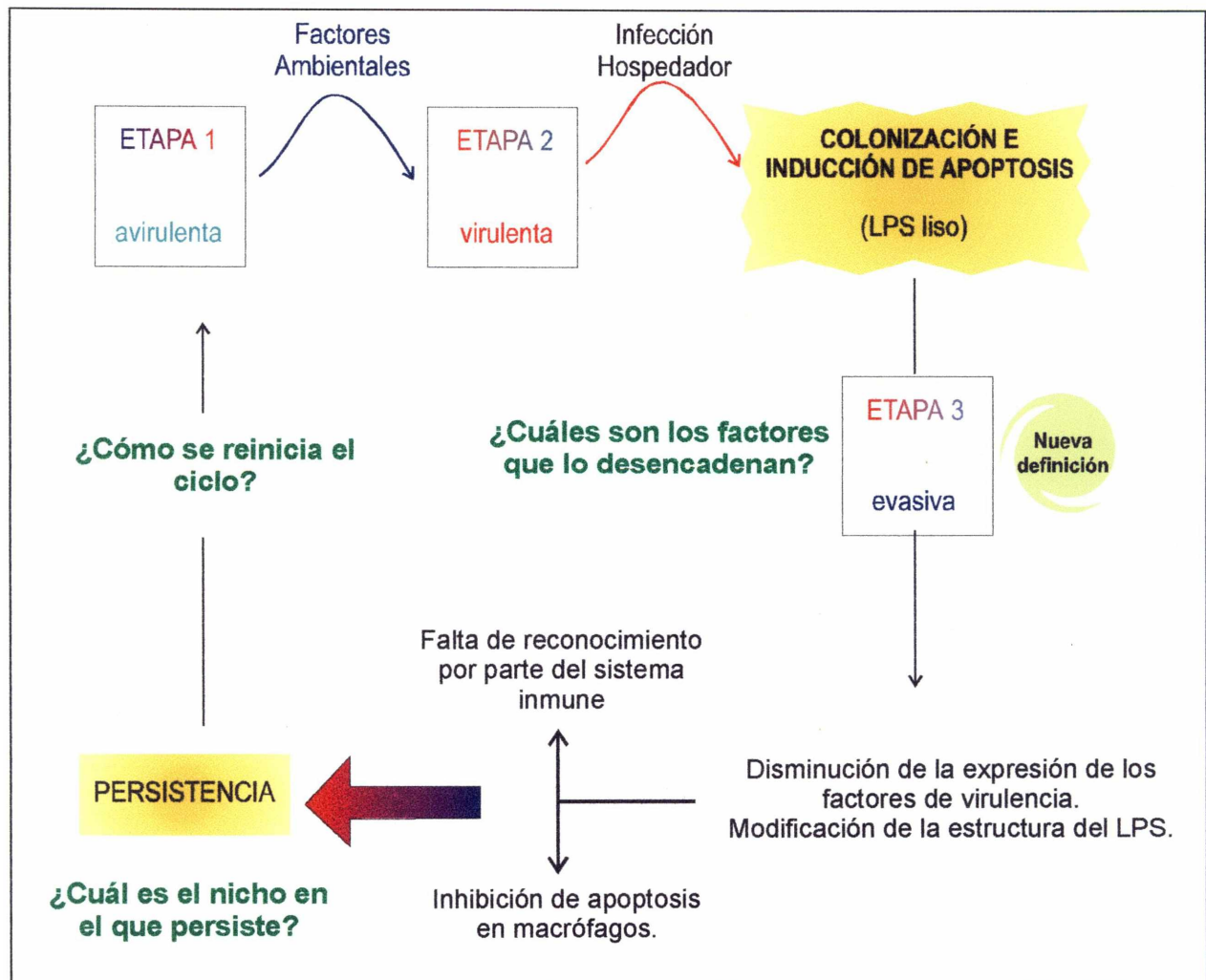
Estos estudios muestran claramente la importancia del LPS con una estructura completa en los primeros estadios de la infección pero no nos permitieron avanzar en el estudio del rol de la forma trunca en la persistencia de la bacteria en el hospedador debido a la incapacidad que presenta esta forma para adherirse a las células del hospedador. Esta dificultad en la adhesión sugiere que la forma trunca del LPS aislada de estadios crónicos de la enfermedad en humanos no estaba presente en las bacterias que iniciaron la infección sino en una progenie derivada de bacterias con LPS liso, que es la forma con que la bacteria es capaz de colonizar. Las modificaciones concomitantes en la expresión de los principales factores de virulencia y la pérdida completa de la reactividad frente a sueros refuerzan la idea de que los cambios estructurales que ocurren durante la infección pueden ayudar a la bacteria a persistir en el hospedador. Más aún, la respuesta humoral dirigida contra las porciones distales del LPS parece ser, según nuestros resultados, la responsable de seleccionar *in vivo* bacterias con un LPS rugoso. Este puede ser el primer paso del cambio estructural hacia un fenotipo rugoso profundo.

Favoreciendo el proceso de persistencia, las bacterias durante el periodo crónico disminuyen la expresión de factores de virulencia (AC-Hly, PRN y FHA) que poseen actividades citotóxicas como ser la inducción de apoptosis sobre células del hospedador. Esta actividad, de estar presente, resultaría perjudicial para el desarrollo de la vida intracelular de la bacteria, un comportamiento ya descrito para *B. bronchiseptica* (3, 9, 10, 20). En relación al rol de la apoptosis en la patogénesis aún no se cuenta con un modelo acabado; sin embargo existe un consenso sobre la inhibición del mismo durante el desarrollo de un proceso crónico de infección para un patógeno con capacidad de sobrevivir intracelularmente. De esta forma el patógeno evitaría la destrucción de las células que lo alojan. En concordancia con esta suposición la disminución en los niveles de expresión de varios factores de virulencia como PRN, FHA y AC-Hly (9) que han sido asociados a procesos apoptóticos junto con la variación estructural del LPS podría obedecer a una necesidad de inhibir procesos apoptóticos sobre determinadas células durante el proceso crónico. Con el fin de analizar las posibles actividades apoptóticas presentadas por el LPS en su forma completa (lípid A-core-trisacárido-antígeno O) o en su forma trunca (lípid A-KDO) realizamos ensayos de apoptosis sobre células en cultivo derivadas de aquellos tipos celulares que se encuentran en íntimo contacto con el patógeno a lo largo de la infección. Analizamos también la actividad apoptótica de los LPS presentes en los aislamientos obtenidos en las infecciones de *B. bronchiseptica* producidas en humanos a fin de observar si existen actividades diferenciales que podrían justificar el cambio observado en la estructura del LPS.

A partir de los resultados obtenidos hemos confeccionado un primer modelo acerca de uno de los posibles roles de la variación estructural del LPS a lo largo de la infección. En particular hemos demostrado que el LPS es capaz de modular la actividad apoptótica de diferentes células del hospedador dependiendo de su estructura. Esto es, *B. bronchiseptica* con un LPS completo junto a la expresión de diferentes factores de virulencia inicia las primeras etapas de la infección e induce la apoptosis de células blancas. Luego para persistir la bacteria reduciría de manera significativa la expresión de los factores proteicos, altamente antigénicos. Nuestros resultados muestran que los LPS truncos o *deep rough* no son capaces de inducir la muerte de monocitos o células derivadas de éstos. Así, el LPS rugoso profundo característico de la fase crónica de la enfermedad jugaría un rol esencial en la vida intracelular.

La estrategia actual para el control de *Bordetella* se focaliza sobre el diseño de vacunas contra *B. pertussis* utilizando componentes proteicos de esta especie como FHA, PRN o Fimbrias. Dado que *B. bronchiseptica* se ha integrado al grupo de especies que son patógenos del hombre, resulta esencial diseñar nuevas estrategias que eviten no sólo la colonización sino también la diseminación de este patógeno. Esta estrategia debe ser compatible y coordinada a la ya desarrollada contra *B. pertussis*. Teniendo en cuenta las características de cronicidad de *B. bronchiseptica*, los componentes que se consideren para completar la vacuna anti *Bordetella* deberán incluir alguno propio de la fase crónica. Entre estos posibles componentes se encuentra el LPS, cuyo estudio se ha iniciado con detalle por primera vez en este trabajo de Tesis.

PERSPECTIVAS



Referencias

1. Appelmelk B.J., Martin S.L., Monteiro M.A., Clayton C.A., McColm A.A., Zheng P., Verboom T., Maaskant J.J., van den Eijnden D.H., Hokke C.H., Perry M.B., Vandenbroucke-Grauls C.M., Kusters J.G. 1999. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun.* 67:5361-6. Erratum in: *Infect Immun* 67:6715.
2. Appelmelk B.J., Shiberu B., Trinks C., Tapsi N., Zheng P.Y., Verboom T., Maaskant J., Hokke C.H., Schiphorst W.E., Blanchard D., Simoons-Smit I.M., van den Eijnden D.H., Vandenbroucke-Grauls C.M. 1998. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 66:70-6.
3. Banemann A., Gross R. 1997. Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect Immun.* 65:3469-3473.
4. Bauer M.E., Welch R.A. 1997. Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun.* 65:2218-24.
5. Burns V.C., Pishko E.J., Preston A., Maskell D.J., Harvill E.T. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
6. de Vries F.P., van Der Ende A., van Putten J.P., Dankert J. 1996. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun.* 64:2998-3006.
7. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol.* 33:2002-2006.
8. Gueirard P., Le Blay K., Le Coustumier A., Chaby R., Guiso N. 1998. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 162:331-337.
9. Guzman C.A., Rohde M., Bock M., Timmis K.N. 1994. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect Immun.* 62:5528-37.
10. Hellwig S.M., Hazenbos W.L., van de Winkel J.G., Mooi F.R. 1999. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 26:203-7.
11. Hozbor D., Rodriguez M.E., Fernandez J., Lagares A., Guiso N., Yantorno O. 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol.* 38:273-8.
12. Idris U.E., Harmon B.G., Udeze F.A., Kadis S. 1993. Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet Pathol.* 30:234-41.
13. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol.* 177:3998-4008.
14. Kitten T., Barrera A.V., Barbour A.G. 1993. Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol.* 175:2516-22.
15. Maskell D.J., Szabo M.J., Butler P.D., Williams A.E., Moxon E.R. 1991. Phase variation of lipopolysaccharide in *Haemophilus influenzae*. *Res Microbiol.* 142:719-24.
16. Pishko E.J., Preston A., Maskell D.J., Harvill E.T. 2003. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun.* 71:86-94.
17. Poole K., Braun V. 1998. Influence of growth temperature and lipopolysaccharide on hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 170:5146-52. Gzyl 2001,
18. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevenes K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskell D.J. 1999. Genetics basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-3767.
19. Preston A., Allen A.G., Cadisch J., Thomas R., Stevens K., Churcher C.M., Badcock K.L., Parkhill J., Barrell B., Maskell D.J. 1999. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect Immun.* 67:3763-7.
20. Schneider B., Gross R., Haas A. 2000. Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun.* 68:7039-48.
21. Wandersman C., Letoffe S. 1993. Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and *Erwinia chrysanthemi* proteases. *Mol Microbiol.* 7:141-50.
22. Wang G., Ge Z., Rasko D.A., Taylor D.E. 2000. Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol Microbiol.* 36:1187-96.

APÉNDICE

Soluciones

Electroforesis SDS-PAGE.

Gel de concentración

Glicina	2,6 M
Sodio dodecil sulfato (SDS)	0,1% p/v
Tris-HCl	0,05 M
pH 6,8	

Gel de separación

Glicina	2,6 M
Sodio dodecil sulfato (SDS)	0,1% p/v
Tris-HCl	0,05 M
pH 8,8	

Buffer de Laemmli.

Sodio dodecil sulfato (SDS)	2% p/v
Glicerol	1% v/v
Na ₂ EDTA	0,02 M
Tris-HCl	0,05 M
pH 6,8	

Buffer de Transferencia Westernblot.

Glicina	1,0 M
Metanol	20% v/v
Tris-HCl	0,025 M

Buffer Tris Sodio (TBS).

NaCl	1,5 M
Tris-HCl	0,5 M

Buffer fosfato (PBS)

KH ₂ PO ₄	0.428 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.39 g/l
NaCl	7.2 g/l
pH 7,4	

Buffer Tris Borato EDTA (TBE).

Tris-HCl	89 mM
Na ₂ EDTA	2,5 mM
H ₃ BO ₃	89 mM
pH 8,2	

Buffer Tris EDTA (TE).

N-lauril sarcosina	0,1% p/v
EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM
pH 8,0	

Soluciones Southern-blot.

Solución 1

NaOH	0,4 M
NaCl	3,0 M

Solución 2

NaOH	8 mM
NaCl	3,0 M

Solución 4

NaH ₂ PO ₄	0,2 M
Na ₂ HPO ₄	0,2 M

Solución de prehibridación

NaCl	0,75 M
Citrato de Na	0,075 M
Sarcosyl	0,1% p/v
Sodio dodecil sulfato (SDS)	0,02% p/v
Bloqueante	1% p/v
pH 7,0	

Buffer1

NaCl	150 mM
Tris - HCl	100 mM
pH 7,5	

Buffer 2

Bloqueante 1% p/v en Buffer 1.

Buffer 3

NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
Tris - HCl	100 mM
pH 9,5	

Sodio Citrato 10X (SSC10X)

NaCl	1,5 M
Citrato de Na dihidrato	0,15 M
pH 7,0	

Medios de cultivo

Stainer-Scholte (SS).

Glutamato de sodio monohidrato	0,57 M
L-Prolina	0,02 M
NaCl	0,43 M
KH ₂ PO ₄	0,036 M
KCl	0,02 M
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	5 mM
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	1,4 mM
Tris – HCl	0,12 M
pH 7.2	
Complemento 20 ml 10X	
L - Cisteína	800 mg
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	200 mg
Ac ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg
HCl _(C)	2 ml

Luria-Bertani (LB).

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5g/l
Glucosa	1 g/l
NaCl	0,085M

SOC

Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	5 g/l
NaCl	10 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

Glicerol Levadura Triptona (GYT)

Glicerol	10% v/v
Extracto de levadura	1,25 g/l
Triptona	1,25 g/l